



CENTRO INTERNACIONAL DE ESTUDOS
DE DOUTORAMENTO E AVANZADOS
DA USC (CIEDUS)

TESIS DE DOCTORADO

**ESCUTICOCILIATOSIS:
MECANISMOS DE EVASIÓN DE LA
RESPUESTA INMUNITARIA DEL
RODABALLO Y DESARROLLO DE
VACUNAS**

Iria Folgueira López

**Departamento de Microbiología y Parasitología
Instituto de Investigación y Análisis Alimentarios**

SANTIAGO DE COMPOSTELA

2019





DECLARACIÓN DE LA AUTORA DE LA TESIS

ESCUTICOCILIATOSIS: MECANISMOS DE EVASIÓN DE LA RESPUESTA INMUNITARIA DEL RODABALLO Y DESARROLLO DE VACUNAS

Dña. Iria Folgueira López

*Presenta su Tesis Doctoral, siguiendo el procedimiento adecuado al
Reglamento, y declara que:*

- 1) La Tesis abarca los resultados de la elaboración de su trabajo.*
- 2) En su caso, en la Tesis se hace referencia a las colaboraciones que
tuvo este trabajo.*
- 3) La Tesis es la versión definitiva presentada para su defensa y
coincide con la versión enviada en formato electrónico.*
- 4) Confirma que la Tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros
autores ni de trabajos presentados por ella para la obtención de
otros títulos.*

En Santiago de Compostela, 27 de septiembre de 2019

Fdo. Iria Folgueira López





AUTORIZACIÓN DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS

ESCUTICOCILIATOSIS: MECANISMOS DE EVASIÓN DE LA RESPUESTA INMUNITARIA DEL RODABALLO Y DESARROLLO DE VACUNAS

Don José Manuel Leiro Vidal

Don Jesús Lamas Fernández

INFORMAN:

Que la presente Tesis Doctoral, corresponde con el trabajo realizado por Dña. Iria Folgueira López bajo su dirección, y autorizan su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como directores de ésta no incurre en las causas de abstención establecidas en Ley 40/2015.

En Santiago de Compostela, 27 de septiembre de 2019

Fdo. José Manuel Leiro Vidal

Fdo. Jesús Lamas Fernández



CONFLICTO DE INTERÉS

ESCUTICOCILIATOSIS: MECANISMOS DE EVASIÓN DE LA RESPUESTA INMUNITARIA DEL RODABALLO Y DESARROLLO DE VACUNAS

Dña. Iria Folgueira López

*Declara no tener ningún conflicto de interés en relación con su Tesis
Doctoral.*

En Santiago de Compostela, a 27 de septiembre de 2019

Fdo: Iria Folgueira López



Los resultados expuestos en la presente Tesis Doctoral han sido publicados o están pendientes de publicación, en los siguientes artículos de investigación:

Folgueira, I.; de Felipe, A. P.; Sueiro, R. A.; Lamas, J. & Leiro, J. (2017). Protocol for cryopreservation of the turbot parasite *Philasterides dicentrarchi* (Ciliophora, Scuticociliatia). *Cryobiology* 80:77-83.

Folgueira, I.; Lamas, J.; de Felipe, A. P.; Sueiro, R. A. & Leiro, J. (2019). Evidence for the role of extrusomes in evading attack by the host immune system in a scuticociliate parasite. *Fish and Shellfish Immunology*, 92: 802-812.

Folgueira, I.; Lamas, J.; de Felipe, A. P.; Sueiro, R. A. & Leiro, J. (2019). Identification and molecular characterization of superoxide dismutases isolated from a scuticociliate parasite: physiological role in oxidative stress. *Scientific Reports*, 9(1): 1-14.



Ós meus pais



**“Para entendermonos non fan falta as mesmas ideas,
fai falta o mesmo respecto”**



AGRADECIMIENTOS

La realización de la presente memoria de Tesis Doctoral ha sido posible gracias al aporte económico recibido a través de subvenciones concedidas por diversos organismos públicos y privados y que se relacionan a continuación:

AYUDAS A PROGRAMAS DE CONSOLIDACIÓN Y ESTRUCTURACIÓN DE UNIDADES DE INVESTIGACIÓN COMPETITIVAS DEL SISTEMA UNIVERSITARIO DE GALICIA (SUG):

Modalidad: Grupos Con Potencial De Crecimiento (GPC)

Nº expediente: GPC2014/069

Inicio-fin: 2014-2016

Entidad subvencionadora: Consejería de Cultura, Educación y Ordenación Universitaria. Dirección General de Promoción Científica y Tecnológica del Sistema Universitario de Galicia (Xunta de Galicia). Programa de Consolidación y Estructuración de Unidades de Investigación Competitivas.

Modalidad: Grupos de referencia competitiva (GRC).

Nº expediente: ED431C 2017/31

Inicio-Fin: 2017-2020

Entidad subvencionadora: Consejería de Cultura, Educación y Ordenación Universitaria. Dirección General de Promoción Científica y Tecnológica del Sistema Universitario de Galicia (Xunta de Galicia). Programa de Consolidación y Estructuración de Unidades de Investigación Competitivas.

PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN:

1.- DISEÑO Y ELABORACIÓN DE NUEVAS VACUNAS QUE PERMITAN UNA MAYOR PROTECCIÓN E INOCUIDAD FRENTE A ESCUTICOCILIADOS PARÁSITOS DEL RODABALLO. Proyecto I+D+i, Programa estatal de Investigación, Desarrollo e Innovación orientada a los retos de la sociedad, Convocatoria 2014. Ministerio de Economía y Competitividad. Ref.: AGL2014-57125-R.

2.- GENERACIÓN DE VACUNAS RECOMBINANTES PARA LA INMUNOPROFILAXIS DE LA ESCUTICOCILIATOSIS DEL RODABALLO. Proyecto I+D+I, Programa estatal de Investigación, Desarrollo e Innovación orientada a los retos de la sociedad, Convocatoria 2017. Ministerio de Economía, Industria y Competitividad. Ref.: AGL2017-83577-R

3.- ADVANCED TOOLS AND RESEARCH STRATEGIES FOR PARASITE CONTROL IN EUROPEAN FARMED FISH. PARAFISHCONTROL. Scientific basis and tools for preventing and mitigating parasitic diseases of European farmed fish. Horizon 2020 – Research and Innovation Framework Programme. Ref.: 634429.

PROYECTOS DE TRANSFERENCIA DE INVESTIGACIÓN:

AVANCES EN LA VACUNACIÓN EN PECES PLANOS (VACUPLAN): FORMULACIÓN VACUNAL ESPECÍFICA. Investigador responsable: Ana Riaza Carcamo –Stolt Sea Farm, S.A. Entidad financiadora: Centro para el Desarrollo Tecnológico Industrial (CDTI). Ministerio de Economía y Competitividad. Ref.: IDI-20160679.

AYUDA DE FORMACIÓN DE PERSONAL INVESTIGADOR:

Beca/contrato de Formación de Personal Investigador (FPI) (BES-2015-071246) financiada por el ministerio de economía y competitividad, asociada al proyecto “Diseño y elaboración de nuevas vacunas que permitan una mayor protección e inocuidad frente a escuticociliados parásitos del rodaballo” (AGL2014-57125-R).





LISTADO DE ABREVIATURAS

A.P.R.O.M.A.R.: Productores de Cultivos Marinos de España

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario

ANOVA: Análisis de varianza

APS: Persulfato amónico

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

ATCC: Type Culture Collection

BSA: Albumina de suero bovino

DAMP: Patrones moleculares asociados a peligro

DEPC: Dietilpirocarbonato

DMSO: Dimetilsulfoxido

dNTP: Desoxinucleótidos trifosfato

DTT: Ditioneitol

E.S.A.C.U.A.: Asociación Española de Productores de
Acuicultura Continental

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

ELISA: Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (*Enzyme-linked immunosorbent assay*)

F.A.O: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

FBS: Suero fetal bovino

FCA: Adyuvante completo de Freund

FELISA: Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas fluorescente (*Fluorescent enzyme-linked immunosorbent assay*)

FIA: Adyuvante incompleto de Freund

FITC: Isotiocianato de fluoresceína

HMDS: Hexametildisilazano

IAC: Cromatografía de inmunoafinidad

IEF: Isoelectroenfoque

Ig: Inmunoglobulina

IMAC: Cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados (*Immobilized metal affinity chromatography*)

IPG: Gradiente de pH inmovilizado (*Immobilized pH gradient*)

IPTG: Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido

kDa: Kilodaltons

L-15: Medio Leibovitz

NADH: Nicotinamida adenina dinucleótido

LISTADO DE ABREVIATURAS

NBT: Nitroazul de tetrazolio

O.P.P.: Organización de Productores Piscicultores

OPD: Ortorfenildiamina

PAMP: Patrones moleculares asociados a patógenos

PBS: Tampón fosfato salino

PCIA: Fenol-cloroformo-alcohol isoamílico

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PI: Punto isoelectrico

PMS: Fenosulfonato

PMSF: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo

PPG: Propilenglicol

PVDF: Polifluoruro de vinilideno

RNS: Intermediarios reactivos de nitrógeno

ROS: Intermediarios reactivos de oxígeno

SDS: Dodecil sulfato sódico

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida dodecil sulfato sódico

SEM: Microscopía electrónica de barrido (*Scanning electron microscopy*)

SOD: Superóxido dismutasa

SSH: Hibridación sustractiva por supresión

TAE: Tris, ácido acético y EDTA

TBS: Tampón tris salino

TBS-T: Tampón tris salino con Tween 20

TEM: Microscopía electrónica de transmisión (*Transmission electron microscopy*)

TEMED: Tetrametiletilendiamina

Tris: Tris (hidroximetil) aminometano

UR3: Anticuerpo monoclonal de ratón anti-rodaballo

VSP: Proteína variable de superficie (*variable surface protein*)

X-Gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido

YCB: *Yeast Carbon Base*

YPGal: *Yeast extract, Peptone and Galactose*

RESUMEN

La escuticociliatosis producida por *Philasterides dicentrarchi* genera mortalidades en rodaballos de cultivo provocando pérdidas económicas. Para evitarlo, es necesario desarrollar medidas profilácticas basadas en la utilización de vacunas, a partir de la búsqueda de antígenos que generen protección, y/o fármacos que inhiban mecanismos vitales para la supervivencia del ciliado. Por tanto, la identificación de antígenos protectores y de moléculas implicadas en el metabolismo, las cuales permiten al escuticociliado sobrevivir en el hospedador, han sido los objetivos principales del presente estudio. Hemos descubierto que el parásito posee dos familias de proteínas (leishmanolisinas y proteínas variables de superficie (VSPs)) asociadas a la membrana celular e involucradas en la evasión de la respuesta inmunitaria del hospedador. También hemos identificado y caracterizado proteínas de secreción producidas por los extrusomas, capaces de generar cápsulas de mucopolisacáridos que protegen del ataque de los factores humorales citotóxicos y superóxido dismutasas, que permiten al ciliado inactivar radicales libres de oxígeno tóxicos asociados al estrés oxidativo generado durante la infección. Para solventar los problemas actuales relacionados con el uso de vacunas inactivadas formuladas en adyuvantes oleosos, también hemos desarrollado un adyuvante biodegradable (hidrogel de quitosano) que presenta capacidad inmunoestimulante similar a los oleosos y resulta menos dañino para el pez. La producción de proteínas recombinantes en levadura, como potenciales antígenos para generar vacunas recombinantes, nos permite incluir los cambios aminoacídicos que se producen entre las diferentes cepas, obteniendo así un antígeno inmunogénico universal que genere respuesta frente a todas ellas. Para conseguir una mayor protección es necesario incluir en la vacuna varios antígenos empleando proteínas quiméricas recombinantes a partir de péptidos antigénicos procedentes de varias proteínas. Estas formulaciones vacunales de quitosano han generado elevados niveles

de protección en ensayos realizados en rodaballo, indicando que esta estrategia podría ser útil para obtener una vacuna universal eficaz frente a la escuticociliatosis.

Palabras clave: Superóxido dismutasas, extrusomas, antígenos, hidrogel de quitosano, vacunas.

RESUMO

A escuticociliatose producida por *Philasterides dicentrarchi* xera mortalidades en rodaballos de cultivo provocando perdas económicas. Para evitalo, é necesario desenvolver medidas profilácticas baseadas no uso de vacinas, mediante a busca de antígenos que xeren protección, e/ou fármacos que inhiban mecanismos vitais para a supervivencia dos ciliados. Polo tanto, a identificación de antígenos protectores e moléculas implicadas no metabolismo, as cales permiten que o escuticociliado sobreviva no hóspede, foron os obxectivos principais do presente estudo. Descubrimos que o parasito ten dúas familias de proteínas (leishmanolisinas e proteínas variables de superficie (VSP)) asociadas á membrana celular e implicadas na evasión da resposta inmune do hóspede. Tamén identificamos e caracterizamos proteínas de secreción producidas polos extrusomas, capaces de xerar cápsulas de mucopolisacáridos que protexen fronte o ataque dos factores humerais citotóxicos, e superóxido dismutasas, as cales permiten ós ciliados inactivar os radicais libres de osíxeno tóxicos asociados ó estrés oxidativo xerado durante a infección. Para resolvermos os problemas actuais relacionados coa utilización de vacinas inactivadas formuladas en adxuvantes oleosos, tamén desenvolvemos un adxuvante biodegradable (hidroxel de quitosano) que presenta capacidade inmunostimuladora similar ós oleosos e resulta menos prexudicial para os peixes. A produción de proteínas recombinantes en lévedos, como antígenos potenciais para xerar vacinas recombinantes, permítenos incluír os cambios de aminoácidos que se producen entre as diferentes cepas, obtendo así un antígeno universal inmunoxénico que xera resposta fronte a todas elas. Para obter unha maior protección é necesario incluír varios antígenos na vacina utilizando proteínas

quiméricas recombinantes a partir de péptidos antixénicos de varias proteínas. Estas formulacións vacinais de quitosano xeraron altos niveis de protección nos ensaios realizados en rodaballo, o que indica que esta estratexia podería ser útil para obter unha vacina universal eficaz fronte a escuticociliatose.

Palabras chave: Superóxido dismutasas, extrusomas, antíxenos, hidroxel de quitosano, vacinas.

ABSTRACT

Scuticociliatosis produced by *Philasterides dicentrarchi* generates mortalities in turbot farms causing economic losses. Therefore, it is necessary to develop prophylactic measures based on vaccines, founded on search of antigens that generate protection, and/or drugs that inhibit vital mechanisms for ciliate survival. Consequently, identification of protective antigens and molecules involved in metabolism, which allows scuticociliate survival in the host, has been the main objective of the present study. We have discovered that this parasite has two protein families (leishmanolysins and variable surface proteins (VSPs)) associated with cell membrane and involved in host's immune response evasion. Furthermore, we have identified and characterized secretion proteins produced by extrusomes, capable of generating mucopolysaccharide capsules that protect against the attack of cytotoxic humoral factors, and superoxide dismutase, which allow to inactivate toxic free oxygen radicals associated with oxidative stress generated during the infection. In order to solve the current problems related to the use of inactivated vaccines formulated with oily adjuvants, we have also developed a biodegradable adjuvant (chitosan hydrogel) that presents an immunostimulatory capacity similar to oily ones and it is less harmful to fish. Recombinant proteins production in yeast, as potential antigens to generate recombinant vaccines, allows us to include amino acid changes that occur between different strains, thus obtaining a universal immunogenic antigen that generates response against all of them. For the purpose of achieving greater protection, it is necessary to include several antigens in the vaccine using

recombinant chimeric proteins from antigenic peptides from different proteins. These chitosan vaccine formulations have generated high levels of protection in assays developed in turbot, indicating that this strategy could be useful to obtain an effective universal vaccine against scuticociliatosis.

Key words: Superoxide dismutases, extrusomes, antigens, chitosan hydrogel, vaccines.



ÍNDICE

Capítulo 1. INTRODUCCIÓN GENERAL	35
1.1. LA ACUICULTURA	35
1.1.1. Acuicultura del rodaballo, <i>Scophthalmus maximus</i> (Linnaeus, 1758).....	37
1.2. BIOLOGÍA Y CULTIVO DEL RODABALLO.....	38
1.2.1. Ciclo de producción	39
1.3. ESCUTICOCILIATOSIS EN EL RODABALLO DE CULTIVO	41
1.4. <i>PHILASTERIDES DICENTRARCHI</i> (DRAGESCO, 1995)	43
1.4.1. Mecanismos de adaptación al parasitismo de los escuticociliados	45
1.4.2. Diferencias entre cepas. Inmunogenicidad y virulencia...	48
1.5. DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO DE LA ESCUTICOCILIATOSIS	49
1.6. SISTEMA INMUNITARIO DEL RODABALLO	50
1.6.1. La respuesta inmunitaria frente a la vacunación.....	52
Capítulo 2. OBJETIVOS.....	57
Capítulo 3. PROTOCOLO DE CRIOCONSERVACIÓN DE <i>P. dicentrarchi</i>	59

3.1. RESUMEN	59
3.2. INTRODUCCIÓN.....	59
3.3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	61
3.3.1. Los animales experimentales	61
3.3.2. Cepas de escuticociliados y cultivo.....	63
3.3.3. Protocolo de congelación.....	64
3.3.4. Protocolo de descongelación	64
3.3.5. Estudios comparativos para la optimización de la crioconservación.....	64
3.3.6. Evaluación de la supervivencia y crecimiento <i>in vitro</i>	67
3.3.7. Diseño del modelo predictivo	68
3.3.8. Evaluación de la virulencia tras la congelación.....	68
3.3.9. Análisis estadístico	68
3.4. RESULTADOS	69
3.4.1. Concentración de ciliados por criovial	69
3.4.2. Efecto del medio de cultivo, de la fase de cultivo y del porcentaje de agente crioconservante sobre la crioconservación de la cepa II de <i>Philasterides</i> <i>dicentrarchi</i>	70
3.4.3. Pruebas con otros crioprotectores a distintas concentraciones, alternancia de medios para la congelación/descongelación y tiempo de conservación de los crioviales a -80 °C	74

3.4.4. Confirmación del protocolo de crioconservación	81
3.4.5. Aplicación del método de crioconservación para otras cepas de <i>Philasterides dicentrarchi</i> y <i>Miamiensis avidus</i>	83
3.4.6. Conservación de la virulencia tras la criopreservación	84
3.4.7. Comparación entre el protocolo de crioconservación desarrollado con otros usados para la crioconservación en <i>Miamiensis avidus</i>	84
3.5. DISCUSIÓN.....	85
Capítulo 4. IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL ENZIMA SUPERÓXIDO DISMUTASA (SOD) Y SU PAPEL FISIOLÓGICO EN EL ESTRÉS OXIDATIVO.....	95
4.1. RESUMEN	95
4.2. INTRODUCCIÓN.....	96
4.3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	97
4.3.1. Purificación de SODs por cromatografía de intercambio iónico	97
4.3.2. Determinación de la actividad de SOD en geles de poliacrilamida.....	98
4.3.3. Secuenciación del genoma de la cepa I1 de <i>P. dicentrarchi</i>	99
4.3.4. Análisis bioinformático de las secuencias de las SODs	99
4.3.5. Producción de proteínas recombinantes en levaduras	100
4.3.6. Inmunolocalización de las SODs	102

4.3.7. Ensayos con ciliados expuestos a radiación ultravioleta (UV)	105
4.4. RESULTADOS	109
4.4.1. Purificación de la fracción citoplasmática que contiene las SODs y evaluación de su actividad enzimática.....	109
4.4.2. Caracterización molecular de las enzimas SODs de <i>P. dicentrarchi</i>	111
4.4.3. Localización celular de las SODs en <i>P. dicentrarchi</i>	122
4.4.4. Expresión de las SODs en trofozoitos de <i>P. dicentrarchi</i> expuestos a radiación ultravioleta (UV) y estrés oxidativo	124
4.5. DISCUSIÓN	126
Capítulo 5. PAPEL DE LOS EXTRUSOMAS COMO MECANISMO DE EVASIÓN DEL CILIADO	135
5.1. RESUMEN	135
5.2. INTRODUCCIÓN.....	136
5.3. MATERIAL Y MÉTODOS	138
5.3.1. Inmunización de los rodaballos	138
5.3.2. Ensayos de inmunización/aglutinación	138
5.3.3. Análisis microscópico	138
5.3.4. Análisis bioinformático de las secuencias de los extrusomas	139

5.3.5. Producción de las proteínas recombinantes r-TMPT2A y r-TMPT4B	140
5.3.6. Vacunación para la obtención de sueros de ratón anti-r-TMPT2A y anti-r-TMPT4B.....	140
5.3.7. Caracterización de las proteínas recombinantes mediante electroforesis bidimensional (2-DE) y Western Blot ..	141
5.3.8. Ensayos inmunológicos para el análisis de la expresión de proteínas de los extrusomas	142
5.3.9. RT-qPCR	143
5.3.10. Análisis de la liberación intracelular de Ca^{2+}	144
5.4. RESULTADOS	144
5.4.1. Cambios morfológicos que se producen en los ciliados al incubarlos con suero inmune de rodaballo	144
5.4.2. Caracterización molecular y bioquímica de proteínas asociadas a los extrusomas.....	147
5.4.3. Expresión y localización de las proteínas de los extrusomas después de la exposición al suero inmune de rodaballo	157
5.4.4. Expresión de genes asociados con los extrusomas y su relación con la descarga de Ca^{2+} intracelular después de la estimulación de los ciliados con suero inmune de rodaballo	160
5.5. DISCUSIÓN	161
Capítulo 6. BÚSQUEDA DE ANTÍGENOS Y CARACTERIZACIÓN PRELIMINAR DE LA FAMILIA DE LAS VSPs.....	165

6.1. RESUMEN	165
6.2. INTRODUCCIÓN.....	165
6.2.1. Proteínas variables de superficie (VSPs).....	169
6.2.2. Leishmanolisinas.....	171
6.3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	177
6.3.1. Diferencias entre cepas (I1, C1 y B1) y ciliados (I1) procedentes de una infección (pase 0; p0) y ciliados que permanecieron dos años en cultivo (pase 45; p45)	177
6.3.2. Antígeno Fab2.....	177
6.3.3. Estudio de la expresión diferencial entre ciliados de la cepa I1 de pase 0 o pase 45 mediante hibridación sustractiva por supresión (SSH)	179
6.3.4. Análisis del genoma y RNA-Seq	185
6.3.5. Producción de la proteína recombinante r-VSP2.....	185
6.3.6. Caracterización de las VSPs	186
6.3.7. Análisis de la expresión de la familia de proteínas VSP en diferentes cepas y condiciones de cultivo.....	187
6.3.8. Análisis bioinformático	188
6.4. RESULTADOS	188
6.4.1. Comparativa de los resultados de mortalidad tras la infección con aislados I1p0, I1p45, C1p0 y B1p100 de <i>P.</i> <i>dicentrarchi</i>	188

6.4.2. Análisis del patrón de bandas entre ciliados de la cepa I1, C1 y B1 de <i>P. dicentrarchi</i>	189
6.4.3. Porcentaje de aglutinación del SIR frente a las distintas cepas.	190
6.4.4. Inhibición de la aglutinación generada por el suero inmune de rodaballo al pre-incubarlo con antígeno Fab2	190
6.4.5. Caracterización del antígeno Fab2	190
6.4.6. Obtención de la secuencia parcial de la VSP1 a partir de los resultados de secuenciación de la hibridación sustractiva	192
6.4.7. Estudio de la modulación de genes entre cepas mediante RNA-seq	192
6.4.8. Análisis de las secuencias completas para las VSPs	192
6.4.9. Caracterización de la proteína recombinante VSP2	193
6.4.10. Caracterización de proteínas de la familia de la VSP ...	194
6.4.11. Análisis comparativo de VSPs.....	196
6.4.12. Análisis de las secuencias completas para las leishmanolisinas	200
6.5. DISCUSIÓN	220
Capítulo 7. ADYUVANTE DE HIDROGEL DE QUITOSANO	227
7.1. RESUMEN	227
7.2. INTRODUCCIÓN.....	227
7.3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	231

7.3.1. Preparación del adyuvante de hidrogel de quitosano	231
7.3.2. Características físicoquímicas del adyuvante de hidrogel de quitosano	231
7.3.3. Estudio de la respuesta tras la inmunización. Estudio comparativo entre el adyuvante de hidrogel de quitosano y un adyuvante oleoso en ratón	232
7.3.4. Estudio de la respuesta tras la inmunización. Estudio comparativo entre el adyuvante de hidrogel de quitosano y un adyuvante oleoso en rodaballo	233
7.4. RESULTADOS	234
7.4.1. Estructura y capacidad de absorción del antígeno	234
7.4.2. Diferencias en los niveles de inmunoglobulinas en sueros de ratón inmunizados con distintos adyuvantes y antígenos.	235
7.4.3. Expresión de los genes IFN γ , IL-4 y TGF β 1	237
7.4.4. Evaluación de daños en la cavidad peritoneal y niveles de anticuerpos en sueros de rodaballos inmunizados.....	240
7.5. DISCUSIÓN	241
Capítulo 8. VACUNACIÓN CON PÉPTIDO QUIMÉRICO RECOMBINANTE Y ENSAYOS DE PROTECCIÓN EN RODABALLO.....	245
8.1. RESUMEN	245
8.2. INTRODUCCIÓN.....	245
8.3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	250

8.3.1. Animales de experimentación.....	250
8.3.2. Antígenos.....	251
8.3.3. Ensayo de vacunación en rodaballos: control de peso, análisis de daños, obtención de suero, análisis del nivel de anticuerpos mediante ELISA y antigenicidad mediante Western Blot	253
8.3.4. Ensayo de infección	253
8.4. RESULTADOS	253
8.4.1. Análisis de la antigenicidad del péptido quimérico recombinante r-pq-VSPs en ratón y conejo	253
8.4.2. Control de peso y análisis de los daños	254
8.4.3. Niveles de anticuerpos y antigenicidad del r-pq-VSPs en rodaballo	255
8.4.4. Grado de protección	257
8.5. DISCUSIÓN	258
CONCLUSIONES	261
BIBLIOGRAFIA	263



Capítulo 1

INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. LA ACUICULTURA

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (F.A.O) el término acuicultura hace referencia al “cultivo de organismos acuáticos tanto en zonas costeras como del interior que implica intervenciones en el proceso de cría para aumentar la producción”.

Existen cerca de 570 especies acuáticas que se cultivan actualmente en todo el mundo, lo que representa una enorme riqueza de diversidad entre las especies. El 80% de la producción acuícola deriva de animales que se encuentra en la parte inferior de la cadena alimentaria, como peces omnívoros y herbívoros, y moluscos. Además, el cultivo de algas supone un recurso importante para la acuicultura ya que son utilizadas para nutrición y para otros usos industriales (cosmética, pigmentos, etc.). La producción mundial de pescado derivado de la acuicultura ha crecido considerablemente en la última década. En 2016, la producción pesquera mundial alcanzó un máximo de aproximadamente 171 millones de toneladas, de los cuales la acuicultura representó un 47% del total; un 53% si se excluyen los usos no alimentarios (preparación de harina y aceite de pescado) (Figura 1). Estas cifras se traducen en 80 millones de toneladas de pescado comestible y 30,1 millones de toneladas de plantas acuáticas, así como 37900 toneladas de productos no alimentarios. La producción de pescado comestible cultivado ascendió a 54,1 millones de toneladas de peces de aleta; 17,1 millones de toneladas de moluscos; 7,9 millones de toneladas de crustáceos y 0,94 millones de toneladas de otros animales acuáticos. En ese mismo año, hubo 37 países en los que la producción de peces cultivados superó a las capturas en el medio natural, siendo

China el principal productor de pescado comestible cultivado (F.A.O, 2018).

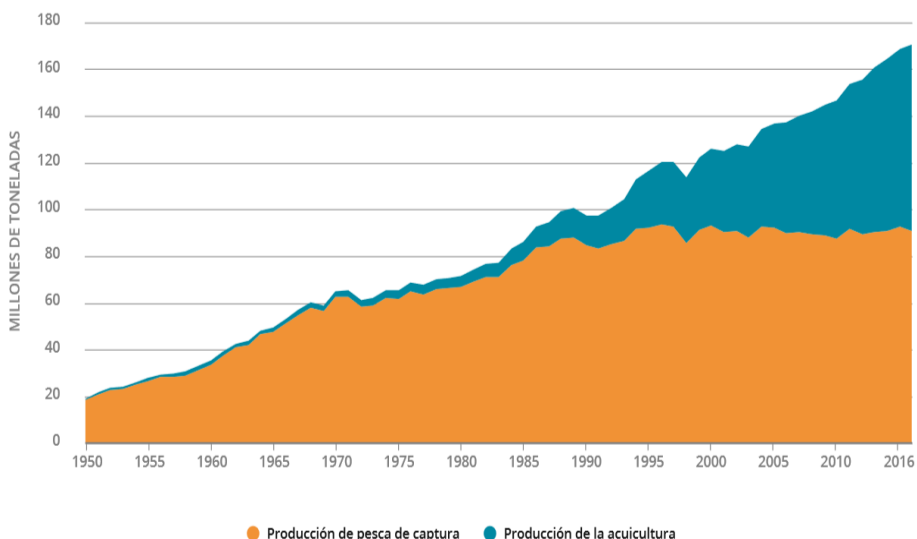


Fig.1: Producción mundial de la pesca de captura y la acuicultura para el periodo 1950-2016, en millones de toneladas (F.A.O, 2018. Política de libre acceso).

En España, las principales especies cultivadas son mejillón (*Mytilus galloprovincialis*), trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), dorada (*Sparus aurata*), lubina (*Dicentrarchus labrax*), corvina (*Argyrosomus regius*), besugo (*Pagellus bogaraveo*), lenguado (*Solea senegalensis*) y rodaballo (*Scophthalmus maximus*); estando situadas la mayoría de las instalaciones acuícolas (un 96,5%) en zonas marinas (F.A.O, 2014). Debido a los kilómetros de costa y a sus características geográficas y climatológicas en Galicia se cultivan tanto moluscos como de peces, llegando a alcanzarse en 2013 una producción de 6729 toneladas de rodaballo cultivado, según el informe elaborado conjuntamente por A.P.R.O.M.A.R. (Productores de Cultivos Marinas de España), E.S.A.C.U.A. (Asociación Española de Productores de Acuicultura Continental) y O.P.P. (Organización de Productores

Piscicultores) en 2014. En 2017, solo 4 años después, Galicia alcanzó las 8461 toneladas de rodaballo de acuicultura (A.P.R.O.M.A.R, 2018).

1.1.1. Acuicultura del rodaballo, *Scophthalmus maximus* (Linnaeus, 1758)

A nivel mundial, el mayor productor de rodaballo de acuicultura es China. En Europa, existe una alta producción acuícola de esta especie en Francia y Países Bajos; sin embargo, el mayor productor europeo es España. Tras el desarrollo de las primeras plantas de cultivo de rodaballo en Escocia en los años 70, el cultivo de esta especie llegó a España, concretamente a Galicia, donde la producción tuvo un crecimiento exponencial en las últimas décadas (Figura 2) (Fernández-Casal y Rodríguez, 2008; A.P.R.O.M.A.R, 2018).

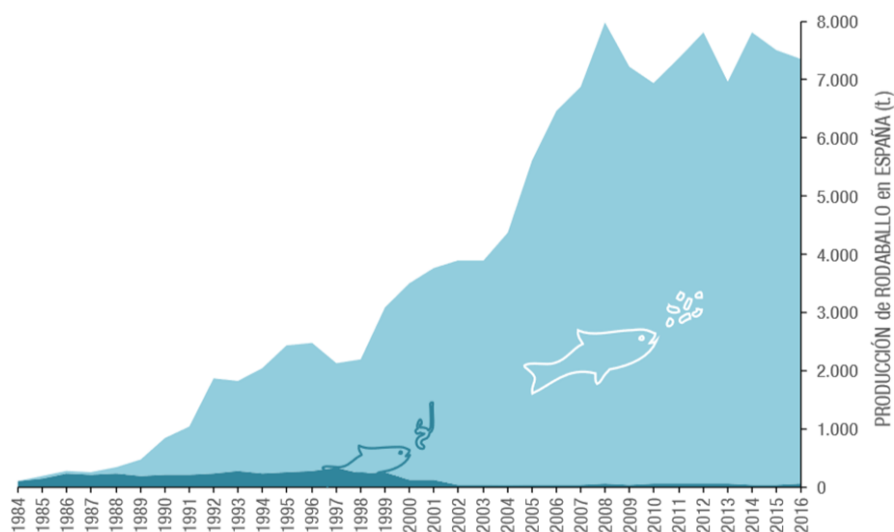


Fig. 2: Evolución de las fuentes de obtención de rodaballo (*S. maximus*) en España (acuicultura y pesca) para el periodo 1984-2016, en toneladas (A.P.R.O.M.A.R, 2018. Política de libre acceso).

En 2017, la cosecha de rodaballo de acuicultura en España fue de 8546 toneladas, un 15,5 % más que la del año anterior. Galicia es, con

diferencia, la principal comunidad autónoma productora de rodaballo en España, 99 %, siendo el 1 % restante producido en Cantabria. Como ocurre con la dorada y la lubina, la cantidad de ejemplares silvestres capturados es cada vez menor, suponiendo la producción de rodaballo de acuicultura más del 99,5 % de la producción total de esta especie en España. En ese mismo año, la producción de juveniles de rodaballo en España fue de cerca de 7 millones de unidades, siendo también en Galicia donde se produce la práctica totalidad de los juveniles de esta especie (A.P.R.O.M.A.R, 2018).

1.2. BIOLOGÍA Y CULTIVO DEL RODABALLO

El rodaballo, *Scophthalmus maximus* (Linneus, 1758), pertenece a la Clase Actinopterygii, División Teleostei, Orden Pleuronectiformes y Familia Scophthalmidae. Se trata de un pez marino que posee cuerpo circular y asimétrico con los ojos sobre el lado izquierdo. Puede llegar a medir 1 m de longitud y pesar 12 kg, llegando a vivir hasta 15 años. Las aletas pectorales son cortas y con forma de espátula de borde redondeado. Las aletas pélvicas también son pequeñas y situadas delante de la aleta anal, la cual, al igual que la aleta dorsal, se extiende a lo largo de los flancos dorsal y ventral. La línea lateral es curvada en su parte anterior debido a que el margen posterior de la aleta caudal es convexo. La piel carece de escamas, pero está provista de tubérculos óseos que le aportan una cierta rugosidad, y muestra una pigmentación mimética que le permite camuflarse con el fondo. El lado ciego (derecho) es blanquecino mientras que el lado ocular (izquierdo) presenta una coloración variable, dependiente del color del fondo, oscilando por lo general entre el gris y el color pardo, con manchas más o menos oscuras (Rodríguez y Fernández, 2005; Rodríguez, 2011) (Figura 3).

Es una especie gonocórica, sin apreciarse diferenciación sexual externa; si bien las hembras suelen ser de mayor tamaño que los machos. Alcanzan la madurez sexual al quinto año de vida y el desove, que tiene lugar en primavera, es secuencial cada 2 o 4 días (usualmente ocurre entre febrero y abril en el Mediterráneo y entre mayo y julio en el Atlántico). Las larvas son simétricas hasta el día 40-50 de vida

cuando, al final de la fase de metamorfosis, el ojo derecho se mueve a la izquierda dando lugar a la asimetría (A.P.R.O.M.A.R., E.S.A.C.U.A. y O.P.P., 2014).



Fig. 3: Rodaballo (*Scophthalmus maximus*) (J.A.C.U.M.A.R., 2006. Política de libre acceso).

La distribución alcanza el Atlántico Norte, desde las costas de Islandia, Noruega y Mar Báltico hasta las costas del norte de Marruecos, siendo menos frecuente en el Mediterráneo. Es una especie marina bentónica que vive en fondos de arena y fango, desde aguas muy someras hasta los 100 m de profundidad, aunque los ejemplares más jóvenes suelen vivir en aguas menos profundas. Ocasionalmente aparece en aguas salobres.

En cuanto a la alimentación es una especie carnívora. Los juveniles se alimentan de moluscos y crustáceos y los adultos principalmente de peces y cefalópodos. Se mueve poco durante el día y captura sus presas durante la noche (Rodríguez y Fernández, 2005; Rodríguez, 2011; A.P.R.O.M.A.R., E.S.A.C.U.A. y O.P.P., 2014).

1.2.1. Ciclo de producción

Para su cultivo, las hembras y los machos reproductores se mantienen separados en tanques con volúmenes entre 20-40 m³ de agua a densidades de 3-6 kg/m³. Los desoves se obtienen extrayendo los gametos (esperma y huevos). Las hembras presentan ciclos de

ovulación con un período aproximado de 70-90 horas. Los huevos son pelágicos, de forma esférica y de diámetro variable entre 0,9 mm y 1,2 mm. El desarrollo embrionario tarda 60-70 días. Después de eclosionar, las larvas de rodaballo miden 2,7-3,1 mm de longitud (Rodríguez y Fernández, 2005).

El cultivo de larvas puede ser semi-intensivo o intensivo. En los sistemas semi-intensivos, las larvas son cultivadas a baja densidad (2-5 larvas/litro) en un gran volumen (50 m³), mientras que en el cultivo intensivo la densidad de larvas es más alta (15-20 larvas/litro) y el volumen del tanque es 20-30 m³. En ambos sistemas la temperatura es 18-20 °C. Las larvas recién eclosionadas se alimentan de sus propias reservas vitelinas; la apertura de la boca ocurre al día 3. En este punto la alimentación se basa en rotíferos y artemia. La primera alimentación se proporciona en tanques cuadrados con esquinas redondeadas y bombeo de agua de mar en circuito abierto o recirculación. Se emplean varios alimentos comerciales en la etapa de primera alimentación (A.P.R.O.M.A.R., E.S.A.C.U.A. y O.P.P., 2014).

La cría de los rodaballos se realiza en tanques cuadrados o circulares (10-30 m³) con bombeo de agua de mar en circuito abierto o recirculación. Se usan sistemas de aireación para mantener el agua saturada de oxígeno. Los juveniles son alimentados con dietas secas peletizadas. El peso varía entre 5-10 g y 80-100 g durante el período de pre-engorde (4-6 meses de duración) (Rodríguez y Fernández, 2005; Rodríguez, 2011).

Para el engorde se pueden utilizar tanques de cemento cuadrados o circulares (25-100 m³) o jaulas sumergidas o flotantes. Para cualquiera de los dos sistemas los elementos que determinan la productividad son la temperatura del agua (14-18 °C) y la calidad de los alevines (Figura 4) (A.P.R.O.M.A.R., E.S.A.C.U.A. y O.P.P., 2014).

En cualquiera de las etapas de cultivo el factor más importante que va a condicionar la producción es la presencia de epizootias. Existe un gran número de patologías asociadas al cultivo de esta especie que pueden poner en peligro la producción por eso es tan importante

incrementar la resistencia a enfermedades (Rodríguez-Ramilo et al., 2013).

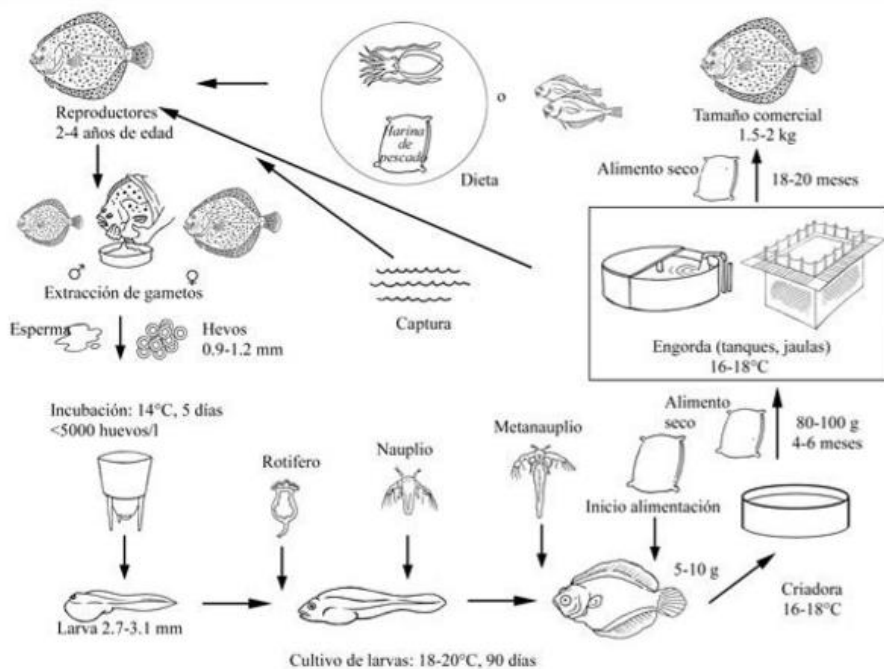


Fig. 4: Ciclo de producción del rodaballo (*S. maximus*) (Rodríguez y Fernández, 2005).

1.3. ESCUTICOCILIATOSIS EN EL RODABALLO DE CULTIVO

Todas las especies de escuticociliados parásitos son altamente histófagas y provocan en los peces ulceraciones de la piel e infecciones sistémicas afectando a diferentes órganos y causando elevadas mortalidades (Song et al., 2009).

Durante la escuticociliatosis se produce una primera fase ectoparásita en la que el ciliado invade la piel y las branquias, alcanzando la dermis y la musculatura, y llegando a provocar hemorragias, úlceras cutáneas, desprendimiento extenso de la

epidermis, edema de las fibras musculares, necrosis e hiperplasia branquial (Ramos et al., 2007; de Felipe et al., 2017). En la segunda fase, se produce una invasión sistémica en la que el ciliado se distribuye por diferentes órganos como el hígado, el tubo digestivo, el bazo, el riñón, el corazón, las glándulas tiroides y el sistema nervioso; observándose en estos órganos lesiones degenerativas y reacciones inflamatorias, así como la aparición líquido ascítico en la cavidad peritoneal (Dragesco et al., 1995; Iglesias et al., 2001; Jee et al., 2001; Ramos et al., 2007; Moustafa et al., 2010; Harikrishnan et al., 2010).

A nivel microscópico, los escuticociliados pueden colonizar la dermis y la epidermis provocando daños severos asociados a procesos de descamación y necrosis (Jee et al., 2001; Jung et al., 2009; Ramos et al., 2007). En las branquias, los ciliados pueden aparecer externamente en las células epiteliales, sin causar daño aparente (Padrós et al., 2001), o dentro de las estructuras branquiales (Jung et al., 2007; Ramos et al., 2007). En el músculo, los ciliados producen miositis degenerativa y necrosis de las fibras musculares, causando hemorragias severas (Padrós et al., 2000; Jung et al., 2007; Ramos et al., 2007). Dentro del sistema digestivo, se han descrito escuticociliados en el tejido conectivo subepitelial del tracto digestivo, en el intestino submucoso y en la serosa gástrica e intestinal (Padrós et al., 2001; Jung et al., 2009). Estos parásitos pueden degradar la mucosa del epitelio intestinal, llegando a necrosar el epitelio y las microvellosidades intestinales, la membrana del estómago y la musculatura gástrica (Azad et al., 2007). En el hígado, los escuticociliados aparecen en estructuras ricas en tejido conectivo y alrededor de las venas y las vías biliares. En casos particulares, se han observado en hepatocitos (Padrós et al., 2001). En el bazo y el riñón, se han detectado principalmente en la serosa, penetrando en el interior del parénquima esplénico y/o renal (Padrós et al., 2001). Cuando infectan el interior de los túbulos renales pueden producir un bloqueo, lo que conduce a una necrosis severa del epitelio tubular y los túbulos colectores (Azad et al., 2007). En el sistema nervioso central, estos parásitos se han encontrado en las meninges, el telencefalo, el mesencefalo, el diencefalo, los lóbulos ópticos, el cerebelo, el bulbo raquídeo, el nervio óptico y los lóbulos olfativos (Padrós et al., 2001;

Azad et al., 2007; Jung et al., 2009). En el corazón solo se han observado en casos de infecciones avanzadas y generalizadas, apareciendo en el epicardio, el endocardio y el interior del ventrículo (Padrós et al., 2001). En el páncreas y las gónadas, los ciliados también aparecen principalmente en zonas ricas en tejido conectivo (Padrós et al., 2001). Además, pueden aparecer en el tejido adiposo. A nivel macroscópico, la escuticociliatosis se puede reconocer por una serie de características, no todas específicas de esta enfermedad: comportamiento anormal, letargia, anorexia, adelgazamiento, frotamiento, alteraciones de la natación (natación lateral y en la superficie del agua), exoftalmia, enrojecimiento y podredumbre de la base de las aletas que puede alcanzar el músculo (exponiendo así los radios de las aletas), pérdida de escamas, aparición de manchas blanquecinas, licuefacción o ablandamiento del cerebro, así como una evidente distensión abdominal producida por la acumulación de líquido ascítico conteniendo ciliados en la cavidad peritoneal, lo que indica la existencia de una importante respuesta inflamatoria (Iglesias et al., 2001; Ramos et al., 2007; Azad et al., 2007, Jung et al., 2009).

1.4. *Philasterides dicentrarchi* (DRAGESCO, 1995)

El agente etiológico de la escuticociliatosis en rodaballo en cultivo es *Philasterides dicentrarchi*. Los primeros brotes tuvieron lugar en el año 2001 (Iglesias et al.) pero desde entonces y, hasta la actualidad, se han sucedido numerosos episodios de escuticociliatosis debido a distintas cepas de este patógeno (De Felipe et al., 2017).

Philasterides dicentrarchi es un ciliado bentónico de vida libre que puede comportarse como endoparásito. En cuanto a su morfología, presenta forma ovoide con la parte anterior puntiaguda y la posterior redondeada. El tamaño oscila entre los 30-42 μm de largo y los 10-22 μm de ancho, en función de la fase en la que se encuentre. El aparato bucal, que se sitúa en la parte anterior y que ocupa el primer tercio de la longitud del cuerpo, posee una membrana paraoral bipartita. El cilio caudal se encuentra en la parte posterior del cuerpo. El número de cinetias somáticas oscila entre 13-15, y tanto el macronúcleo como el micronúcleo están situados cerca del centro del organismo. El sistema

de membranas superficiales está formado por la membrana limitante externa, la membrana alveolar externa y la membrana alveolar interna (De Felipe et al., 2017). Estas dos últimas membranas conforman los sacos alveolares, los cuales contienen enzimas que pueden controlar la regulación del metabolismo y la homeostasis celular (Mallo et al., 2016). Cerca de estos se encuentran las mitocondrias, las cuales se disponen por debajo del córtex a lo largo de la superficie celular. Próximos a la membrana plasmática se encuentran los extrusomas, orgánulos de exocitosis asociada con la respuesta adaptativa en ciliados (Rosati y Modeo, 2003). Presenta división celular por fisión binaria (Dragesco et al., 1995; Paramá et al., 2006) (Figura 5).

La mayoría de escuticociliados experimentan fases de alimentación morfológicamente distintas, incluyendo las formas de microstoma y macrostoma y, en ocasiones, tomites de natación rápida que no se alimentan. En todas las cepas de *P. dicentrarchi* se han observado formas microstomas y tomites, estas últimas aparecen cuando las condiciones de cultivo son desfavorables, como la escasez de nutrientes la presencia de sustancias o compuestos nocivos o en etapas avanzadas de cultivo durante la fase estacionaria (Morais et al., 2009; De Felipe et al., 2017).



Fig. 5: *Philasterides dicentrarchi*. Fotografía realizada al microscopio óptico de ciliados teñidos con tinción de plata.

Philasterides dicentrarchi habita en costas eutróficas y es un organismo eurihalino con gran capacidad para adaptarse fácilmente a distintas condiciones ambientales (Kim et al., 2004), siendo capaz de generar altas mortalidades (70-80%) (Harikrishnan et al., 2010). Se transmite a través del agua, pudiendo acumularse en las paredes de los

tanques de cultivo o en la piel y branquias de los propios peces. Penetran a través de la boca, las branquias o microheridas que pueda tener el pez en su superficie. Se propaga por el torrente sanguíneo afectando al cerebro, al hígado y/o al intestino, llegando a invadir órganos como el bazo, el riñón o el músculo a través del tejido conectivo. Los peces afectados por escuticociliatosis muestran síntomas tanto a nivel externo (úlceras cutáneas, oscurecimiento de la piel, exoftalmia) como a nivel interno (acumulación de líquido ascítico, hemorragias) (Puig et al., 2007; Moustafa et al., 2010).

1.4.1. Mecanismos de adaptación al parasitismo de los escuticociliados

Los ciliados poseen una serie de componentes que les permiten detectar el peligro. Mediante la quimiotaxis pueden percibir estímulos, tanto positivos como perjudiciales, que van a desencadenar una respuesta. En caso de que sean negativos, se pondrán en marcha los mecanismos de defensa necesarios para vencer o superar esa situación adversa. La supervivencia de un organismo, presa potencial de otro, depende de la efectividad de sus respuestas físicas, químicas y de comportamiento. Las defensas inducibles son respuestas flexibles en las que las sustancias liberadas por depredadores estimulan a los organismos presa potenciales para que se transformen en fenotipos resistentes a los depredadores. Las defensas inducidas pueden ser altamente protectoras; sin embargo, los beneficios a menudo se equilibran con los costos de acondicionamiento físico, como la disminución de las tasas de crecimiento o una reducción del potencial reproductivo (Wicklow, 1997).

Los ciliados utilizan diferentes estrategias para protegerse de depredadores o en respuesta a cambios ambientales. El ciliado *Euplotes octocarinatus* cambia su forma de ovoide a circular, gracias a una reorganización del citoesqueleto, para aumentar su tamaño como mecanismo de defensa en presencia de distintos depredadores (Kusch, 1993). Cambios similares inducidos por situaciones de depredación se han descrito en especies del género *Colpidium* (Fyda, 1998).

Este tipo de modificaciones también se han observado como respuesta frente a cambios ambientales desfavorables (Castro et al., 2016). La escasez de nutrientes en el medio de cultivo puede provocar que algunos parásitos pasen de la forma microstoma a la forma macrostoma (De Felipe et al., 2017). *Uronema marinum*, es capaz de dividirse formando grupos de células móviles que pueden sobrevivir más tiempo gracias al aumento en la movilidad (Fenchel, 1990). Otros parásitos son capaces de adaptarse a condiciones de hambruna o inanición mediante la criptobiosis, una estrategia que consiste básicamente en la disminución en la tasa metabólica, el incremento de la actividad autofágica para disminuir el volumen celular, la deshidratación del citoplasma y la impermeabilización del cisto o quiste para una mayor protección frente a las condiciones externas (Keilin, 1959). Es decir, además de un cambio fisiológico, las estrategias de defensa también se basan en la inanición y en la generación de formas de resistencia (quistes) como se ha descrito en *Pseudocohnilembus pusillus* (Fenchel, 1990), *Colpoda aspera* (Jiang et al., 2018) y en *Euplotes encysticus* (Chen et al., 2018), entre otros.

Muchos ciliados se reproducen de manera asexual en condiciones de cultivo normales, pero en condiciones de inanición tiene lugar la conjugación. Las células se transforman en pre-conjugantes y se reproducen sexualmente cuando son sexualmente maduras. En este proceso, los individuos viejos son reemplazados por organismos nuevos con distintos genotipos. El intercambio de material genético va a generar un aumento en la variabilidad genética, lo que se traduce en una mayor adaptación y supervivencia de la especie (Sugiura y Harumoto, 2001).

Otro tipo de situación desfavorable que da lugar a estos cambios es la presencia de sustancias nocivas en el medio de cultivo. Muchos ciliados cambian su estructura debido a que no son capaces de acumular y/o degradar estos compuestos. Bajo estas condiciones también se producen cambios a nivel de comportamiento y crecimiento. Para combatir la toxicidad, los ciliados han desarrollado otros mecanismos de defensa, como el aumento de la producción de varias enzimas antioxidantes y la expresión genes inducidos por el estrés

(Somasundaran et al., 2018). Este tipo de estrategias también son llevadas a cabo por el patógeno cuando este se encuentra dentro del hospedador, ya que cambios en la producción de enzimas pueden llegar a evadir la respuesta inmunitaria del hospedador como método de supervivencia. *Philasterides dicentrarchi* es capaz de modificar su metabolismo y habitar ambientes anaerobios. Mediante la modulación en la expresión de diferentes genes es capaz de adaptarse rápidamente a condiciones de hipoxia, como las que se dan dentro del pez, y a cambios en las concentraciones de sales. Junto con estos mecanismos de adaptación, el ciliado desarrolla procesos de detoxificación de radicales libres que le permiten defenderse del sistema inmunitario del rodaballo. Estos mecanismos están regulados principalmente por tres enzimas antioxidantes (la catalasa, la peroxidasa y la superóxido dismutasa) que le permiten al ciliado eliminar los ROS generados por el pez (Lamas et al., 2009; Morais et al., 2009).

Los protozoos también son capaces de liberar sustancias al exterior celular como mecanismo de defensa. Poseen una serie de orgánulos limitados por membranas que, por estímulos de naturaleza química o mecánica, descargan su contenido. Estas estructuras se encuentran situadas por debajo de la membrana plasmática, entre los sacos alveolares, y reciben el nombre de extrusomas (Paramá et al., 2006). Dentro de los ciliados, se han descrito los siguientes tipos de extrusomas en función de su contenido y/o tipo de sustancias que liberan: mucocistos, liberan moco de naturaleza paracristalina (*Tetrahymena pyriformis*); tricocistos, liberan filamentos paracristalinos, (*Paramecium caudatum*); toxicisto y haptocistos libera sustancias venenosas (*Didinium nasutum* y *Acineta tuberosa*, respectivamente) (Hausmann, 1978).

Ahondar en el estudio de los mecanismos adaptativos de *Philasterides dicentrarchi*, sobre los cuales solo se han desarrollado algunos estudios preliminares, puede suponer un gran avance a la hora de diseñar estrategias para luchar contra este patógeno.

1.4.2. Diferencias entre cepas. Inmunogenicidad y virulencia

En su parte externa, los ciliados presentan antígenos, los cuales modulan para adaptarse a diferentes condiciones o defenderse de la respuesta inmunitaria del hospedador, llegando a estar asociados con la virulencia (Swennes et al., 2006; Xu et al., 2009). Varios trabajos describen las diferencias en virulencia entre diferentes aislados/cepas de ciliados (Puig et al., 2007; Álvarez-Pellitero et al., 2004). Distintos antígenos han sido ampliamente estudiados en *Cryptocaryon irritans* (Priya, 2012; Mo et al., 2019) y en *Ichthyophthirius multifiliis*, donde se ha visto que estos antígenos generan altos niveles de anticuerpos, capaces de inmovilizar a los parásitos en ensayos *in vitro* (Hatanaka et al., 2007; Hatanaka et al., 2008). Sin embargo, se ha visto que esta capacidad es dependiente del serotipo (Wang et al., 2002; Clark y Forney, 2003).

El análisis de aislados obtenidos en diferentes piscifactorías ha permitido la caracterización de distintas cepas del ciliado *P. dicentrarchi* tanto a nivel molecular como a nivel de virulencia (Budiño et al., 2012). En 2008, Piazzon y colaboradores observaron diferencias en la virulencia entre dos cepas de *P. dicentrarchi*, sugiriendo que las diferencias en el grado de virulencia podían estar asociadas tanto a las diferencias en los mecanismos de patogenicidad como a diferencias en la resistencia a las defensas inmunitarias del hospedador. Piazzon y cols. (2008) también vieron que algunos componentes o fracciones del aislado I1 eran más estimulantes e inducían estallido respiratorio y una mayor expresión de citoquinas en los leucocitos del rodaballo en comparación con el aislado C1, aunque este mostraba mayores niveles de actividad de SOD (superóxido dismutasa) y catalasa que I1. Ambos aislados presentaban resistencia a especies reactivas de oxígeno y nitrógeno y fueron altamente susceptibles a la incubación con complemento y anticuerpos, pero I1 fue más resistente que C1. Estudios posteriores han demostrado la existencia de varias cepas en este ciliado y que hay cepas entre las que no existe protección cruzada en rodaballos vacunados (Budiño et al., 2012).

Se ha observado que al exponer a *P. dicentrarchi* a suero inmune de rodaballo o conejo inactivado con calor se produce la aglutinación

de los ciliados sin que el suero llegue a producir lisis. Sin embargo, a las pocas horas, los ciliados se liberan asumiéndose así cambios en sus antígenos de inmovilización de superficie. También se observó que ciliados procedentes de cultivo no generaban aglutinación, sugiriendo que los trofozoítos infectados en el pez expresan algún antígeno de inmovilización de superficie diferente al expresado en las condiciones de cultivo. Estas posibles diferencias se han observado en los perfiles proteicos llevados a cabo mediante análisis SDS-PAGE, donde se observaron diferencias entre el patrón de bandas en ciliados de cultivo y ciliados aislados de peces infectados, sugiriéndose que es necesaria la expresión de ciertas proteínas para que los ciliados se adapten al hospedador (Iglesias et al., 2003b; Lee y Kim., 2008).

En algunos estudios también se ha asociado la variación en el grado de virulencia al tiempo que los ciliados permanecen en cultivo. Todavía no se sabe con claridad el motivo, pero estas diferencias pueden estar relacionadas con una menor producción de proteasas por parte de los ciliados en el medio de cultivo con el paso del tiempo, lo que haría de estos ciliados unos patógenos menos virulentos (Kwon et al., 2003; Álvarez-Pellitero et al., 2004). Aunque en algunas especies los autores han sugerido que estas diferencias en el grado de virulencia pueden estar asociadas a variaciones antigénicas mediante las cuales los patógenos pueden modificar sus antígenos al pasar de las condiciones de cultivo a una infección del hospedador (Müller y Gottstein, 1998).

Por todo ello, resulta importante identificar antígenos que puedan generar protección frente a diferentes cepas y analizar como *P. dicentrarchi* puede modular la expresión de estos en función de las condiciones en las que se encuentren.

1.5. DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO DE LA ESCUTICOCILIATOSIS

El diagnóstico de la escuticociliatosis se puede llevar a cabo mediante la observación de frotis de úlceras o sangre y líquido ascítico al microscopio óptico, utilizando tinciones específicas con el fin de observar caracteres taxonómicos relevantes para la identificación (Iglesias et al., 2001; Budiño et al 2011a). También se pueden hacer análisis moleculares mediante PCR y secuenciación de diferentes

genes, lo que permite determinar la especie e incluso la cepa que provocó la infección. (Budiño et al., 2012; De Felipe et al., 2017).

Para evitar la aparición de esta enfermedad es de vital importancia que, dentro de las plantas de cultivo, los protocolos de higiene se cumplan exhaustivamente, la manipulación de los peces sea adecuada con el fin de evitar microlesiones y que las condiciones de cultivo sean óptimas, reduciendo los factores de estrés. La escuticociliatosis puede estar asociada a otros problemas como infecciones bacterianas o de otros parásitos, generándose así mayores complicaciones y aumentando la importancia de llevar a cabo dichas medidas. Otro factor importante a tener en cuenta es la temperatura, ya que la enfermedad no se desarrollará a temperaturas inferiores a 18°C, siendo óptima entre 20-23°C (Iglesias et al., 2003a).

La Guía para la Gestión Sanitaria en Acuicultura (Rodgers y Furones, 2011), ha clasificado al escuticociliado parásito *Philasterides dicentrarchi* como parásito de riesgo 2, regional-marino para el rodaballo. Debido a que la legislación europea es bastante restrictiva a la hora de usar fármacos en plantas de cultivos, el mejor método de evitar esta enfermedad es implementar medidas higiénicas que actúen como primera barrera, así como el uso de químicos como la formalina o el peróxido de hidrógeno, o el empleo de antibióticos (Harikrishnan et al., 2010).

1.6. SISTEMA INMUNITARIO DEL RODABALLO

La funcionalidad del sistema inmunitario de los peces va a estar condicionada por las circunstancias ambientales en las que el organismo viva, siendo susceptible a condiciones de estrés como cambios de temperatura, mala alimentación, cambios osmóticos, contaminantes, etc. (Lushchak, 2016; Lushchak, 2011). Muchos de los organismos patógenos son oportunistas y su virulencia se ve favorecida por estas condiciones desfavorables para el pez (Ellis, 2001). Para entender cómo funcionan los sistemas de defensa en los organismos marinos tenemos que tener en cuenta que existen dos tipos de sistemas inmunitarios: el sistema inmunitario innato (natural o inespecífico) y el sistema inmunitario adquirido (adaptativo o específico) (Rauta et al., 2012;

Ashfaq et al., 2019). El sistema inmunitario innato está presente prácticamente en todos los seres vivos, desde los organismos unicelulares como las bacterias hasta los mamíferos (Lozano, 2012). En el caso de los peces el sistema inmunitario innato es muy antiguo filogenéticamente, dando lugar a diferencias significativas a la hora de llevar a cabo estudios de inmunogenicidad comparativa entre especies de este grupo frente al grupo de los mamíferos (Rauta et al., 2012). En algunos casos, el sistema inmunitario innato se basa en mecanismos inmunitarios básicos como péptidos antimicrobianos (citoquinas y defensinas), el sistema del complemento o la fagocitosis (llevada a cabo por macrófagos y neutrófilos). Se trata de un mecanismo de defensa que comienza con una respuesta de tipo humoral mediante la generación de moco, que actúa como barrera física, ya que dificulta la entrada de invasores, y la activación de componentes humorales del sistema inmunitario innato como complemento, lisozimas, péptidos antimicrobianos o lectinas, etc. (Akhter et al., 2015). La respuesta celular es llevada a cabo por diferentes poblaciones de leucocitos (mastocitos, células citotóxicas no específicas, macrófagos y granulocitos) (Lieschke y Trede, 2009).

Los patógenos son reconocidos por receptores de reconocimiento de patrón (receptores tipo Toll, entre otros) que se encuentran en los macrófagos (células del sistema inmunitario), los cuales inducen la expresión de varias citocinas inflamatorias, como el TNF- α o la IL-1 β , y quimiocinas. Estos mecanismos han sido descritos en peces, incluido el rodaballo (Ordás et al., 2007; Roca et al., 2008; Rebl et al., 2010). Este reconocimiento está relacionado con otro mecanismo llamado quimiotaxis, llevado a cabo por los fagocitos, y que está inducido por diferentes factores del complemento (quimiocinas y prostaglandinas, entre otros). La migración celular de agentes inflamatorios tiene lugar principalmente en la cavidad peritoneal de los peces, siendo los neutrófilos, muy abundantes en la sangre, los primeros en migrar al lugar de inflamación. Durante las primeras horas el número de neutrófilos se incrementa y, posteriormente, existe un aumento en la población de macrófagos (Afonso et al., 2005; Cuesta et al., 2007). Se piensa que los neutrófilos extravasados una vez han realizado su

función se convierten en apoptóticos para mejorar la resolución de la inflamación (Filep et al., 2009). A la vez que se produce la migración celular, tiene lugar una activación celular que propicia la estimulación de diversas rutas metabólicas entre las que se encuentran la producción de ROS (intermediarios reactivos de oxígeno) y RNS (intermediarios reactivos de nitrógeno), los cuales participan en la destrucción del patógeno y contribuyen a causar lesiones tisulares. Esto sucede porque, cuando las células fagocíticas del pez ingieren partículas, se produce un aumento en el consumo de oxígeno, independiente de la respiración mitocondrial, dando lugar a un proceso conocido como explosión respiratoria. Como consecuencia se generan radicales libres de oxígeno y nitrógeno altamente citotóxicos frente a bacterias y parásitos invasores (Martin y Feng, 2009; Mathias et al., 2009; Olavarría et al., 2010).

Si los patógenos son capaces de superar las barreras física y los otros elementos que constituyen la inmunidad innata estos pueden ser identificados por los componentes que conforman el sistema inmune adaptativo (Rauta et al., 2012). En los peces, este tipo de respuesta inmunitaria está mediada por diferentes tipos de leucocitos, incluidos los linfocitos T, que comprenden linfocitos T citotóxicos (CTL) y células T auxiliares (Th) (Ashfaq et al., 2019). La inmunidad adaptativa desempeña un papel vital en la protección contra infecciones recurrentes mediante la generación de células de memoria (inmunidad celular) y receptores específicos solubles y unidos a la membrana (inmunidad humoral) como los receptores de células T y las inmunoglobulinas (Igs), que permiten la eliminación de los patógenos que generan infecciones en peces (Burgos-Aceves et al., 2016).

1.6.1. La respuesta inmunitaria frente a la vacunación

El control y la prevención de enfermedades en acuicultura se lleva a cabo fundamentalmente a través de tratamientos químicos, antibióticos y vacunas. Sin embargo, al existir una regulación muy exigente en cuanto a los tratamientos permitidos, la vacunación es el método preferido. Las vacunas se pueden administrar básicamente de tres formas: por la vía oral, por inmersión y mediante inyección; siendo la última la que suele inducir una mejor respuesta inmunitaria (Bowden

et al., 2002; Sommerset et al., 2005). Dentro de esta opción, la inyección intraperitoneal es seguramente el mejor método disponible para prevenir la aparición de enfermedades en peces (Tafalla et al., 2013).

La cavidad peritoneal de peces sin vacunar contiene una mezcla de células, cuya proporción y tipo celular suele variar entre especies, siendo las células más comunes los macrófagos, los neutrófilos y los linfocitos (do Vale et al., 2002). En algunas especies se ha descrito también la presencia de células granulares eosinófilas, aunque en una proporción muy baja (Afonso et al., 2005). La inyección de vacunas y otros agentes inflamatorios en la cavidad peritoneal genera un incremento en el número de células, especialmente neutrófilos y macrófagos (do Vale et al., 2002; Chaves-Pozo et al., 2005).

Los preparados antigénicos pueden contener el microorganismo entero, como es el caso del uso de bacterinas, que contienen bacterias muertas inactivadas con formol. En las vacunas con organismos vivos atenuados, se utilizan microorganismos vivos con una virulencia disminuida y, por lo tanto, tienen una menor capacidad para causar enfermedad. Otros preparados contienen vacunas de subunidades, compuestas por determinados antígenos obtenidos mediante purificación o utilizando la tecnología del ADN recombinante, así como porciones de material genético (vacunas de ADN) (Orbegozo-Medina et al., 2019).

Los antígenos por sí solos no inducen una buena respuesta, por lo que es necesario recurrir al uso de adyuvantes para incrementar su inmunogenicidad, aumentando la respuesta inmunitaria frente al antígeno y prolongándola en el tiempo. Los adyuvantes oleosos son los más usados, siendo el más ampliamente utilizado en experimentación el adyuvante completo de Freund (FCA), que está compuesto por una suspensión de *Mycobacterium* inactivada por calor, un aceite mineral y un surfactante (Tafalla et al., 2013). Debido a su alta toxicidad, el FCA ha sido reemplazado paulatinamente por el adyuvante incompleto de Freund (FIA). Este adyuvante genera una más lenta y menor respuesta inmunitaria, pero es menos agresivo ya que en su composición no está

presente la suspensión de *Mycobacterium* inactivada por calor (Tafalla et al., 2013). Otro adyuvante oleoso, en este caso muy utilizado en peces, es el que aparece con la marca comercial Montanide, el cuál ha sido utilizado tanto en vacunas frente a bacterias como frente a parásitos, induciendo generalmente una buena respuesta inmunitaria (Ninomiya et al., 2001; Ravelo et al., 2006, Lamas et al., 2008). Sin embargo, los adyuvantes oleosos suelen causar daños importantes en el sitio de la vacunación, como pueden ser la formación de granulomas y adhesiones internas, y a menudo provocan una disminución del crecimiento en los peces vacunados (Noia et al., 2014).

También se han realizado muchos estudios, y se siguen llevando a cabo investigaciones, en relación con uso de tratamientos inmunoestimulantes con microesferas, generadas a partir de polímeros, las cuales no parecen tener efectos adversos relevantes y además inducen una buena respuesta inmunitaria (Paramá et al., 2005; León-Rodríguez et al., 2012 y 2013).

En el caso particular de la escuticociliatosis, la inyección de preparaciones purificadas de antígenos ha demostrado ser eficaces frente a esta enfermedad mediante la producción de anticuerpos frente a estos antígenos (Iglesias et al., 2003b). En 2008, se desarrolló una vacuna inactivada frente a un aislado de *P. dicentrarchi* capaz de producir una protección relativa del 77% y 66% pasados uno y cinco meses tras la segunda dosis, respectivamente, lo que indica que la emulsión utilizada de antígeno más adyuvante oleoso induce una protección duradera contra la infección por este parásito en rodaballo cultivado. En ese mismo año, se optimizó la formulación de esta vacuna, elevando al 100% la protección obtenida mediante una mezcla de 10^6 ciliados/ml; 0,2% de formalina y 50% de adyuvante (Seppic Montanide ® ISA 763A) (Lamas et al, 2008). Sin embargo, a pesar de la protección inducida, este adyuvante generó daños en la cavidad peritoneal de los peces (Noia et al., 2014).

Hoy en día no hay evidencia de que exista una vacuna que pueda proteger frente a diferentes cepas de *P. dicentrarchi*. Rodaballos vacunados con distintos aislados muestran diferentes niveles de

protección, y la protección efectiva solo es alcanzada cuando se usa el mismo aislado en la vacunación y en la infección (Piazzon et al., 2008; Budiño et al., 2012). El hecho de desarrollar una vacuna que no genere daños en el pez y que pueda inducir una alta protección frente a diferentes cepas supondría una importante herramienta contra la escuticociliatosis.





Capítulo 2

OBJETIVOS

En los últimos 15 años se ha generado mucha información sobre diferentes aspectos relacionados con la fisiología y la virulencia de *P. dicentrarchi*; sin embargo, todavía existen incógnitas relevantes sobre cómo este ciliado evade la acción del sistema inmunitario del hospedador, especialmente en los primeros instantes tras la infección en los que interacciona con componentes séricos o tras el ataque de los leucocitos.

En base a las investigaciones previas realizadas por nuestro grupo de investigación se ha conseguido obtener una vacuna que contiene ciliado entero inactivado como antígeno y que induce una buena protección en rodaballo frente al ciliado; sin embargo, se desconoce cuáles son los antígenos específicos que inducen esa protección. Este conocimiento es básico para generar otro tipo vacunas que puedan inducir una protección universal frente a las diferentes cepas de *P. dicentrarchi*, entre las cuales no existe protección cruzada.

Se ha visto que los ciliados pierden la virulencia en cultivo. Para poder mantener parásitos virulentos de forma eficiente sin tener que realizar infecciones periódicas en el pez, y sin que esto acarree gastos en el mantenimiento ni problemas de contaminación a la hora de manejar los cultivos, se hace necesaria una técnica que permita disponer de ciliados virulentos de forma rápida y sencilla.

El presente proyecto de tesis pretende abordar estos aspectos; por lo que se han planteado los siguientes objetivos:

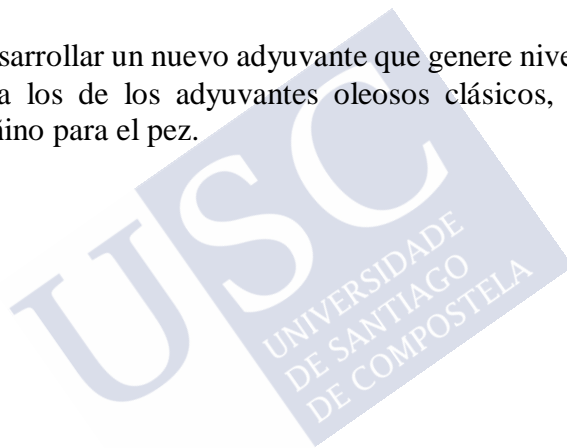
1. Desarrollar un protocolo de criopreservación de los ciliados que permita conservarlos durante largos periodos de tiempos sin necesidad de cultivarlos de manera continuada *in vitro*, lo que supondría un

enorme ahorro de tiempo, así como la disminución del riesgo de que se produzca contaminación o pérdida de virulencia.

2. Estudiar los mecanismos de defensa del ciliado frente a ROS, mediados por las enzimas superóxido dismutasas (SOD), y de evasión, mediados por los extrusomas, con el fin de desarrollar fármacos inhibidores o vacunas frente a *Philasterides dicentrarchi*.

3. Identificar proteínas del ciliado que induzcan protección en el rodaballo y generar péptidos quiméricos recombinantes como antígenos en vacunas frente a una o varias cepas.

4. Desarrollar un nuevo adyuvante que genere niveles de respuesta similares a los de los adyuvantes oleosos clásicos, pero resultando menos dañino para el pez.



Capítulo 3

PROTOCOLO DE CRIOCONSERVACIÓN DE *P. dicentrarchi*

3.1. RESUMEN

El protocolo desarrollado permite mantener con éxito cepas de *Philasterides dicentrarchi* y también cepas comerciales del género *Miamiensis*, manteniendo su virulencia. Los resultados obtenidos indican que el protocolo de criopreservación permite el mantenimiento de las cepas durante un largo periodo de tiempo sin que estas pierdan la virulencia, lo que resulta de gran importancia ya que, tras la descongelación, los ciliados pueden ser utilizados para estudios de protección, producción de vacunas y ensayos para analizar los mecanismos de evasión y defensa; reduciéndose así las diferencias que puedan darse entre distintos cultivos. Además, se ha demostrado que con esta metodología se obtienen mejores resultados en comparación con otras utilizadas en distintos escuticociliados, logrando una mayor supervivencia tras la descongelación partiendo de una menor concentración inicial de ciliados. Se ha comprobado que la fase de crecimiento del cultivo es el factor más importante para la crioconservación. Los ciliados deben de haber alcanzado la fase estacionaria (día 6 de cultivo) ya que durante la fase logarítmica el porcentaje de supervivencia es menor.

3.2. INTRODUCCIÓN

El método utilizado en el laboratorio para el mantenimiento de aislados de escuticociliados se lleva a cabo mediante la realización de subcultivos. Esta forma de conservación, además de acarrear un gasto económico en material y una inversión de tiempo, supone un riesgo debido a los posibles problemas de contaminación asociados a la manipulación. Al mismo tiempo, mediante esta metodología los ciliados conservan la capacidad de infectar al rodaballo hasta

aproximadamente los primeros veinte pases; generándose diferencias en la virulencia en cultivos *in vitro* a largo plazo (mayor número de pases) (Álvarez-Pellitero et al., 2004; Song et al., 2009), por lo que es necesario realizar infecciones experimentales periódicas en peces para recuperar la virulencia (Paramá et al., 2003). Por otra parte, varios estudios han demostrado la existencia de una variación intraespecífica en *Philasterides dicentrarchi* que genera diferencias antigénicas entre cepas y que pueden ser alteradas durante el mantenimiento del subcultivo serial que afecta a la protección después de la vacunación (Piazzon et al., 2008; Budiño et al., 2011b; Budiño et al., 2012). Hasta ahora no se había logrado la crioconservación del parásito escuticociliado *P. dicentrarchi*; sin embargo, el logro de este objetivo permitiría evitar las desventajas del subcultivo (también observadas en el cultivo de otros protozoos), trabajo intensivo, evitar la contaminación bacteriana y fúngica de cultivos, minimizar la deriva genética manteniendo las características únicas de las cepas, preservar la infectividad y la inmunogenicidad de las cepas, etc. (Booth et al., 1996; Miyake et al., 2004; Shaw-Saliba et al., 2016; Bastiaens et al., 2016; Patrapuvich et al., 2016).

Para mantener distintas especies de protozoos en el laboratorio durante largos períodos de tiempo sin frecuentes subcultivos se han probado técnicas como el secado, la liofilización y la crioconservación (James, 2004; Miyake et al., 2004; Gwo et al., 2005).

La crioconservación o criopreservación es el proceso mediante el cual las células o tejidos son congelados a temperaturas que oscilan entre los -80 °C y los -196 °C. A estas temperaturas tan bajas se disminuyen las funciones vitales, llegando a cesar incluso las reacciones bioquímicas que darían lugar a la muerte celular, por lo que es posible mantener a un organismo crioconservado durante largos periodos de tiempo (Baust et al., 2009).

Por lo tanto, con esta técnica se eliminan las desventajas debidas al mantenimiento *in vitro* como la duración de los procedimientos utilizados, las dificultades en el aislamiento inicial, la pérdida de cepas, la contaminación durante las manipulaciones, los cambios en las

características biológicas y metabólicas originales o el restablecimiento de infecciones *in vivo* (Miyake et al., 2004; De Paoli, 2005). El subcultivo en serie, particularmente de cepas axénicas, también puede dar como resultado la pérdida de características biológicas tales como la virulencia (Kwon et al., 2003).

Cepas de escuticociliados marinos de los géneros *Methanophrys*, *Miamiensis*, *Parauronema*, *Paranophrys*, *Pseudocohnilembus* y *Uronema* han sido criopreservadas en medios de crioconservación que utilizan glicerol (propan 1, 2, 3-triol), metanol y dimetilsulfóxido (DMSO) como agentes crioconservantes (Simione y Brown, 1991; Anderson et al., 2009).

El objetivo de este trabajo fue elaborar un protocolo de crioconservación eficaz, con un elevado redimiento en la supervivencia tras la descongelación, para el almacenamiento a largo plazo de la especie escuticociliada parasitaria del rodaballo *Philasterides dicentrarchi*. Para ello, se desarrolló y optimizó un protocolo de conservación similar al usado en escuticociliados del género *Miamiensis*, realizando pruebas mediante la modificación de distintos parámetros involucrados en la crioconservación.

3.3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.3.1. Los animales experimentales

Los animales utilizados en la presente tesis doctoral fueron tratados según los criterios de protección, control, cuidado y bienestar animal, siguiendo los requerimientos legislativos referentes al uso de animales para la experimentación, según el Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación. Todos los animales han sido manipulados por personal acreditado del acuario o por los profesores José Manuel Leiro Vidal y Jesús Lamas Fernández (categorías B, C y D). Todos los protocolos empleados han sido aprobados por el Comité de Bioética de la Universidad de Santiago de Compostela.

Los rodaballos, *Scophthalmus maximus* (Linnaeus, 1758), de unos 50 g de peso, fueron obtenidos de Stolt Sea Farm y durante los ensayos se mantuvieron en tanques de 250 L con recircularización de agua de mar, aireación constante, fotoperiodo de 12 h luz/oscuridad, temperatura de 17-18 °C y se alimentaron diariamente con pienso comercial (Skretting, Burgos, España). El tiempo de aclimatación de los peces a las instalaciones y a estas condiciones desde la llegada hasta el inicio del ensayo fue de dos semanas como mínimo.

Para la experimentación en rodaballo se siguió el procedimiento “*Mecanismos de interacción Philasterides dicentrarchi – rodaballo e desenvolvemento de ferramentas para o control da escuticociliatose*” con código 15004-15-001, el cual se llevó a cabo en el acuario de la Universidad de Santiago de Compostela.

Para los ensayos realizados en sucesivos capítulos se utilizaron hembras de ratón (*Mus musculus* Linnaeus, 1758) de la cepa ICR (Swiss) CD-1 de 8-10 semanas de edad adquiridos del Animalario Central de la Universidad de Santiago de Compostela y que procedían de la empresa Charles River Laboratories (Barcelona). Condiciones animalario USC.

Para la experimentación en ratón se siguieron los procedimientos “*Mejora de una vacuna frente a Philasterides dicentrarchi para un control eficaz de la escuticociliatosis en el rodaballo de cultivo*” con código 15007 AE/09/INV MED 02/ PAT 05/ ET, “*Caracterización de la variabilidad intraespecífica en escuticociliados del rodaballo y búsqueda de antígenos protectores para establecer estrategias eficaces de diagnóstico y control*” con código 15007AE /10 / FUN 01 / IMN 06 / JMLV1 e “*Inmunización con antígenos parasitarios*” con código 15007 AE /12 / FUN 01 / PAT 05 / E / FMU4. Todos estos procedimientos se llevaron a cabo en el Animalario del Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Santiago de Compostela.

Para la experimentación en conejo (*Oryctolagus cuniculus* Linnaeus, 1758) de la cepa New Zealand White (capítulo 8) se siguió el

procedimiento “*Producción de anticuerpos policlonales en conejo frente a antígenos de protozoos ciliados parásitos de peces*” con código 03/19/LU-002. Estos procedimientos se llevaron a cabo en el Animalario de Experimentación Animal. Sección de Animalario Experimental (Lugo) perteneciente a la Red de infraestructuras de Apoyo e Investigación y al Desarrollo Tecnológico (RIAIDT) de la Universidad de Santiago de Compostela.

Todos los ensayos de la presente tesis han seguido los criterios aquí expuestos.

3.3.2. Cepas de escuticociliados y cultivo

Las cepas de *Philasterides dicentrarchi* fueron aisladas de líquido ascítico procedente de rodaballos infectados de forma natural durante brotes de escuticociliatosis en distintas piscifactorías de Galicia (Budiño et al., 2011b). El mantenimiento de los ciliados se llevó a cabo en medio Leibovitz L-15 (medio L-15) suplementado con suero fetal bovino al 10%, lípidos (lecitina y Tween 80), nucleótidos y glucosa (medio L-15 completo estándar) bajo condiciones de cultivo descritas por Iglesias et al. (2003a).

Las cepas Ma y Ma/2 de *Miamiensis avidus* depositadas por A. T. Soldo y E. B. Small con el nombre *Miamiensis avidus* Thompson y Moewus (ATCC® 50179TM y ATCC® 50180TM, respectivamente) fueron adquiridas de la Type Culture Collection (ATCC, EEUU). Ambas cepas fueron cultivadas axénicamente en medio 1651 MA ATCC® (LGC Standards, España) a 25°C y subcultivadas cada 3 días, aproximadamente.

A la hora de analizar el crecimiento *in vitro*, las diferentes cepas de *P. dicentrarchi* y de *M. avidus* se incubaron a 21 °C en frascos de cultivo de 25 cm², a una concentración inicial de 5x10⁴ ciliados/mL en un volumen final de 30 mL de medio 1651 MA ATCC® diluido 1:1 en agua bidestilada (medio MM). Cada día, durante los 6 días que duró el seguimiento del cultivo, se cogieron 3 muestras de 15 µL del frasco de cultivo, se inactivaron los ciliados con glutaraldehído (Sigm-Aldrich) al 0,25%, y se contaron en un hemocitómetro (Iglesias et al., 2003a).

3.3.3. Protocolo de congelación

Los ciliados se concentraron por centrifugación a 700 x g durante 5 minutos y se resuspendieron en 0,5 mL del medio correspondiente en cada caso. Los viales (criotubos estériles de plástico con tapa de rosca (Nunc, Thermo Scientific, China)), fueron depositados en una caja de congelación celular (CoolCell, Biocision), que disminuye la temperatura de su contenido en $-1^{\circ}\text{C} / \text{min}$, y almacenados en un congelador a -80°C durante 2 horas. Posteriormente, los crioviales fueron dispuestos dentro de las cajas de un contenedor de nitrógeno líquido para su conservación.

3.3.4. Protocolo de descongelación

Los crioviales almacenados en el nitrógeno líquido se pasaron a un baño de agua a 37°C y se dejaron descongelar durante 2 minutos. A continuación, los ciliados se concentraron por centrifugación a temperatura ambiente para eliminar el medio de crioconservación en condiciones de esterilidad. Los ciliados fueron resuspendidos en 0,5 mL de medio MM y transferidos a un frasco de cultivo de 25 cm² (Corning™ Cell Culture Treated Flasks) completando con medio hasta un volumen final de 2,5 mL. Para cada ensayo se utilizaron dos crioviales por frasco (volumen final 5 mL). Los frascos de cultivo se incubaron a 21°C en posición horizontal y se llevó a cabo un control del crecimiento diario mediante visualización al microscopio invertido (Nikon Eclipse CFL60, Japón).

3.3.5. Estudios comparativos para la optimización de la crioconservación

Para ajustar las condiciones del ensayo y así obtener los máximos niveles de supervivencia se llevaron a cabo estudios comparativos mediante los cuales se evaluaron los distintos parámetros involucrados en la crioconservación (Tabla 1). Para todas las pruebas se utilizaron ciliados de la cepa I1 de *Philasterides dicentrarchi*.

Factor	Variable	Concen- tración de ciliados	Día de Cultivo	Medio de cultivo			%de criopro- tectores	Tiempo a -80 °C
				Pre- conge- lación	Conge- lación	Descon- gelación		
Concen- tración de ciliados	2,5x10 ⁵ ; 5x10 ⁵ ; 1x10 ⁶ o 2x10 ⁶	-	2	MM	MM	MM	11% DMSO y 2,5; 5 o 10% glicerol	2h
Día de cultivo	2	5x10 ⁵	-	MM	MM	MM	11% de DMSO y 2,5; 5 o 10% de glicerol	2h
				MM	L-15	MM		
				MM	AMA	MM		
	4			MM	MM	MM		
				MM	L-15	MM		
				MM	AMA	MM		
	6			MM	MM	MM		
				MM	L-15	MM		
MM	AMA	MM						
Criopro- tectores	PPG	5x10 ⁵	6	MM	MM	MM	11% DMSO y 2,5; 5 o 10% PPG	2h
	Metanol						11% DMSO y 2,5; 5 o 10% metanol	
	DMSO						5% glicerol y 2,5; 5; 11 y 16% DMSO	
	FBS						90% FBS; 88% FBS y 11% DMSO; 90% FBS y 5% glicerol o 83% FBS, 11% DMSO y 5% glicerol	
Medio de conge- lación/des- conge- lación	-	5x10 ⁵	6	MM	MM	MM	11% DMSO y 5% glicerol, 11% DMSO, 5% glicerol o 90% FBS	2h
				MM	MM	L-15		
				MM	L-15	L-15		
				L-15	MM	MM		
				L-15	MM	L-15		
				L-15	L-15	L-15		
Tiempo a -80 °C	-	5x10 ⁵	6	MM	MM	MM	11% DMSO y 5% glicerol	2h
								24h

Tabla 1: Ensayos comparativos llevados a cabo teniendo en cuenta distintos factores para la optimización del protocolo de crioconservación.

3.3.5.1. Efecto de la concentración de ciliados

El primer factor a tener en cuenta fue la concentración de ciliados. Durante las primeras pruebas se utilizaron $2,5 \times 10^5$; 5×10^5 ; 1×10^6 o 2×10^6 ciliados por criovial en medio MM con un 11% de DMSO y un 2,5; 5 o 10% de glicerol, respectivamente. Los ciliados utilizados en este ensayo procedían de un cultivo de 2 días.

3.3.5.2. Efecto de la fase de cultivo y agentes crioprotectores

Posteriormente, se analizó conjuntamente el día de cultivo y el medio de criopreservación. Para todos estos ensayos, utilizamos 5×10^5 ciliados recogidos a diferentes etapas de cultivo (2, 4 y 6 días) en 0,5 mL de medio. Se probó una combinación de crioprotectores usando DMSO al 11% y glicerol al 2,5; 5; 7,5 o 10% en cada caso, en tres medios distintos: 1) medio MM, 2) medio L-15 y 3) agua de mar artificial (en g/L: 23,926 g NaCl; 4,008 g Na_2SO_4 ; 0,677 g KCl; 0,196 g NaHCO_3 ; 0,098 g KBr; 0,026 g H_3BO_3 ; 10 g Cl_2Mg ; 2,22 g CaCl_2 ; Kester et al., 2003) (AMA).

A continuación, se probaron dos compuestos más como agentes crioprotectores: propilenglicol (PPG) y metanol. Para ello, los ciliados se resuspendieron en 0,5 mL de medio MM con un 11% de DMSO y un 2,5; 5; 7,5 o 10% de PPG o metanol, en cada caso.

También se probaron diferentes concentraciones de DMSO. En este caso, los ciliados se resuspendieron en 0,5 mL de medio MM con un 5% de glicerol y un 2,5; 5; 11; 16 o 22% de DMSO en cada caso.

Además, se analizó si el hecho de utilizar suero fetal bovino (FBS) en el proceso de criopreservación tenía algún efecto. En este caso, se utilizaron ciliados procedentes de un cultivo de día 6, los cuales se congelaron en 0,5 mL de medio MM que contenía FBS al 84%, FBS al 84% y DMSO al 11%, FBS al 84% y glicerol al 5% o FBS al 84%, DMSO al 11% y glicerol al 5%. Como controles de este ensayo también se utilizó medio MM con solo glicerol al 5%, con solo DMSO al 11% o glicerol al 5% y DMSO al 11%.

Por último, y con el fin de mejorar los resultados obtenidos hasta el momento, se llevaron a cabo dos pruebas más. Por un lado, se probó a congelar y descongelar los ciliados en medio L-15 como alternativa al medio MM usando 5×10^5 ciliados por criovial de cultivos a día 6 en medio MM o L-15 y utilizando en las mezclas de crioconservación solo glicerol al 5%, usando solo DMSO al 11%, usando una combinación de ambos y usando solo FBS al 90% en medio MM o medio L-15, respectivamente. Por otro lado, se incrementó hasta 24 horas el tiempo que los crioviales permanecían a -80°C en la caja de congelación celular (CoolCell, Biocision) antes de ser pasados al contenedor de nitrógeno líquido. En este caso, los ciliados de día 6 de cultivo se crioconservaron en medio MM con un 5% de glicerol y un 11% de DMSO.

3.3.6. Evaluación de la supervivencia y crecimiento *in vitro*

Después de la descongelación, los frascos fueron observados al microscopio invertido para comprobar la viabilidad y morfología. La supervivencia fue evaluada mediante la movilidad de los parásitos. Para ello, se hizo un recuento del número de ciliados en movimiento en distintos campos del frasco con el objetivo 20X. Los resultados obtenidos fueron expresados como número de ciliados móviles (NCM) por frasco de cultivo utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Supervivencia} = \text{NCM/frasco} = (\text{NCM}_1 \times S / \text{Sf} \times \text{Nf}) \times V$$

dónde:

NCM₁: número de ciliados móviles en la muestra después de la descongelación.

S: superficie del frasco de cultivo ($25 \times 10^2 \text{ mm}^2$)

Sf: superficie de un campo con el objetivo 20X ($0,95 \text{ mm}^2$)

Nf: número de campos del frasco de cultivo contados ($n = 5$)

V: volumen total de muestra (5 mL)

Los recuentos se llevaron a cabo en tres frascos (triplicados) para calcular las medias y la desviación estándar para la supervivencia, calculada a 24, 48 y 72 h tras la descongelación.

Para la viabilidad, los resultados fueron obtenidos de la misma manera y expresados en porcentaje (%) sobre el total de ciliados usados en el ensayo.

3.3.7. Diseño del modelo predictivo

Para evaluar los efectos de dos componentes de la criopreservación; la concentración de glicerol como crioprotector (A) y el día de cultivo de los ciliados (B), sobre la viabilidad de *P. dicentrarchi* tras la congelación se desarrolló un modelo predictivo aplicando un diseño factorial 3^2 con el programa STATGRAPHICS Centurion XVI version 16.1.15 Windows (Statgraphics.net, Madrid), como describió Lamas et al. en 2008. Este programa crea un diseño factorial a partir de 10 resultados (% de viabilidad a 24 h tras la descongelación) obtenidos de la combinación de 2 factores (% de glicerol y día de cultivo).

3.3.8. Evaluación de la virulencia tras la congelación

Dos grupos de peces, de 5 rodaballos cada uno, fueron infectados intraperitonealmente con 0,1 mL de ciliados a una concentración de 10^6 ciliados/mL en tampón fosfato salino (PBS: 0.015 M solución tampón fosfato, 0.15 M NaCl, pH 7.2) (Paramá et al., 2003). Para uno de los grupos se utilizaron ciliados frescos (procedentes de un cultivo de larga duración) y para el otro grupo ciliados descongelados (poco tiempo en medio de cultivo). La infección fue confirmada *post mortem* por la presencia de ciliados en órganos y tejidos.

3.3.9. Análisis estadístico

Los resultados fueron expresados como los valores de las medias \pm la desviación estándar calculados a partir de cinco valores ($n=5$). Para el análisis estadístico se utilizó un t-test usando el método de Kolmogorov y Smirnov para el cálculo de la normalidad de los datos.

En otros capítulos de esta tesis, los datos fueron examinados por análisis unidireccional de la varianza (ANOVA) seguido de un test de Tukey-Kramer para comparaciones múltiples.

Las diferencias entre los grupos dentro de cada ensayo fueron consideradas significativas a partir de $P \leq 0,05$.

3.4. RESULTADOS

3.4.1. Concentración de ciliados por criovial

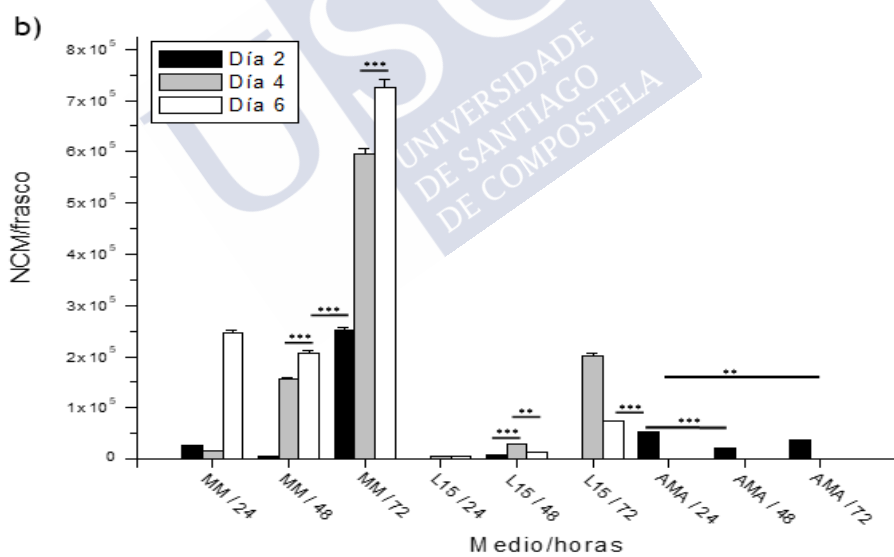
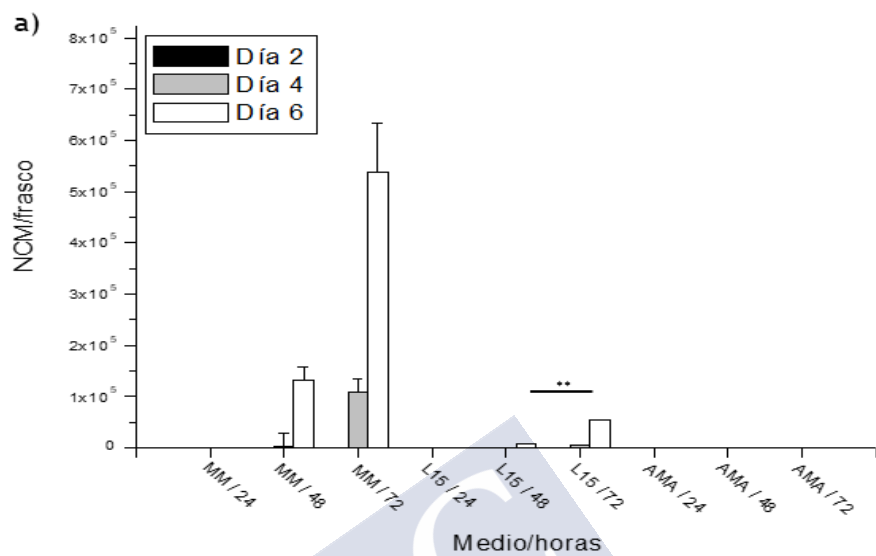
Para establecer la concentración óptima de ciliados por criovial se congelaron $2,5 \times 10^5$; 5×10^5 ; 1×10^6 y 2×10^6 trofozoitos por tubo en medio MM con un 11% de DMSO y un 2,5; 5 o 10% de glicerol, respectivamente. Solo se observaron ciliados móviles cuando el porcentaje de glicerol usado fue del 5%. Sin embargo, el porcentaje de supervivencia varió en función del número de ciliados iniciales por criovial. Si partimos de $2,5 \times 10^5$ ciliados/criovial no se obtiene supervivencia. En aquellos crioviales en los que la concentración inicial fue de 1×10^6 y 2×10^6 ciliados sí se observó supervivencia, pero en valores inferiores con respecto a los obtenidos al utilizar 5×10^5 ciliados/criovial, dónde se alcanzaron los niveles más altos de ciliados móviles (253743 NCM/frasco) (Tabla 2).

Concentración inicial de ciliados/criovial	2,5% de glicerol y 11% de DMSO en medio MM	5% de glicerol y 11% de DMSO en medio MM	10% de glicerol y 11% de DMSO en medio MM
$2,5 \times 10^5$	0±0	0±0	0±0
5×10^5	0±0	253742,6±6001,6	0±0
1×10^6	0±0	799,111±66,2	0±0
2×10^6	0±0	63,5±3,0	0±0

Tabla 2: NCM/frasco a 72 horas tras la descongelación de ciliados congelados a diferentes concentraciones por criovial en medio MM con un 11% de DMSO y un 2,5; 5 o 10% de glicerol. Los resultados representados indican el valor de las medias ± las desviaciones estándar del NCM/frasco contados en cinco crioviales.

3.4.2. Efecto del medio de cultivo, de la fase de cultivo y del porcentaje de agente crioconservante sobre la crioconservación de la cepa I1 de *Philasterides dicentrarchi*

Varios factores que pueden afectar a la eficacia de la crioconservación fueron evaluados conjuntamente. Uno de estos factores fue el medio de cultivo utilizado para el crecimiento de los ciliados. Se utilizaron tres medios distintos, donde los escuticociliados se mantuvieron 6 días en cultivo antes de la criopreservación: 1) medio MM, 2) medio L-15 y 3) agua de mar artificial (AMA). Los mayores niveles de supervivencia tras la descongelación se obtuvieron en aquellas muestras en las que los ciliados se crecieron en MM durante 6 días y en las que se utilizó un 5% de glicerol como crioprotector combinado con un 11% de DMSO (Figura 1). En medio MM y en L-15 el cultivo entra en fase estacionaria a partir del tercer día mientras que en agua de mar artificial no se observa crecimiento en el número de parásitos, ya que el cultivo se mantiene sin cambios durante el periodo de estudio (Figura 2A). El mayor crecimiento se alcanzó con el medio MM, en el cual la mayoría de los ciliados presentaban la forma microstoma y solo una minoría presentaba la forma tomita a día 6 de cultivo. Por el contrario, prácticamente todos los ciliados cultivados en agua de mar artificial presentaban la forma tomita el mismo día de cultivo (Figura 2B).



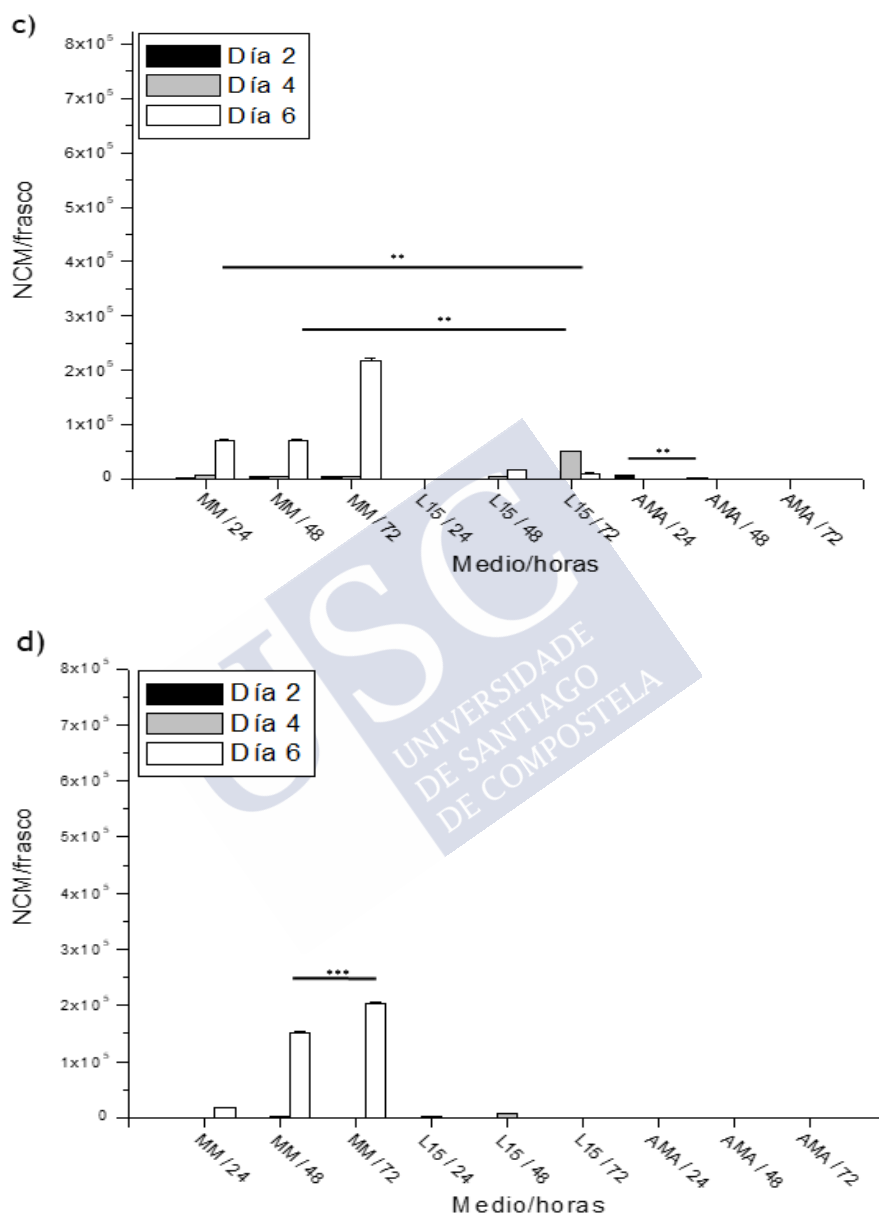


Fig. 1: Efecto del medio de cultivo, etapa de crecimiento y del porcentaje de glicerol como agente crioprotector en la eficacia de la criopreservación en la cepa I1 de *Philasterides dicentrarchi*. Los trofozoitos fueron cultivados en medio MM, en

medio L-15 y en agua de mar artificial (AMA). Los crioviales (0,5 mL) contenían 10^5 trofozoitos/mL, procedentes de un cultivo a diferente fase de crecimiento (2, 4 y 6 días), los cuales fueron criopreservados en un contenedor de N_2 líquido en un medio de criopreservación que contenía MM suplementado con un 11% de DMSO y diferentes concentraciones de glicerol: A) 2,5 %; B) 5,0 %; C) 7,5 % o D) 10%. La supervivencia tras la descongelación fue expresada como el número de ciliados móviles (NCM)/frasco a 24, 48 y 72 h tras la descongelación. Los resultados representados indican el valor de las medias \pm las desviaciones estándar del NCM/frasco contados en cinco crioviales. Los asteriscos indican el nivel de significación: *** $P < 0,05$ y ** $P < 0,01$.

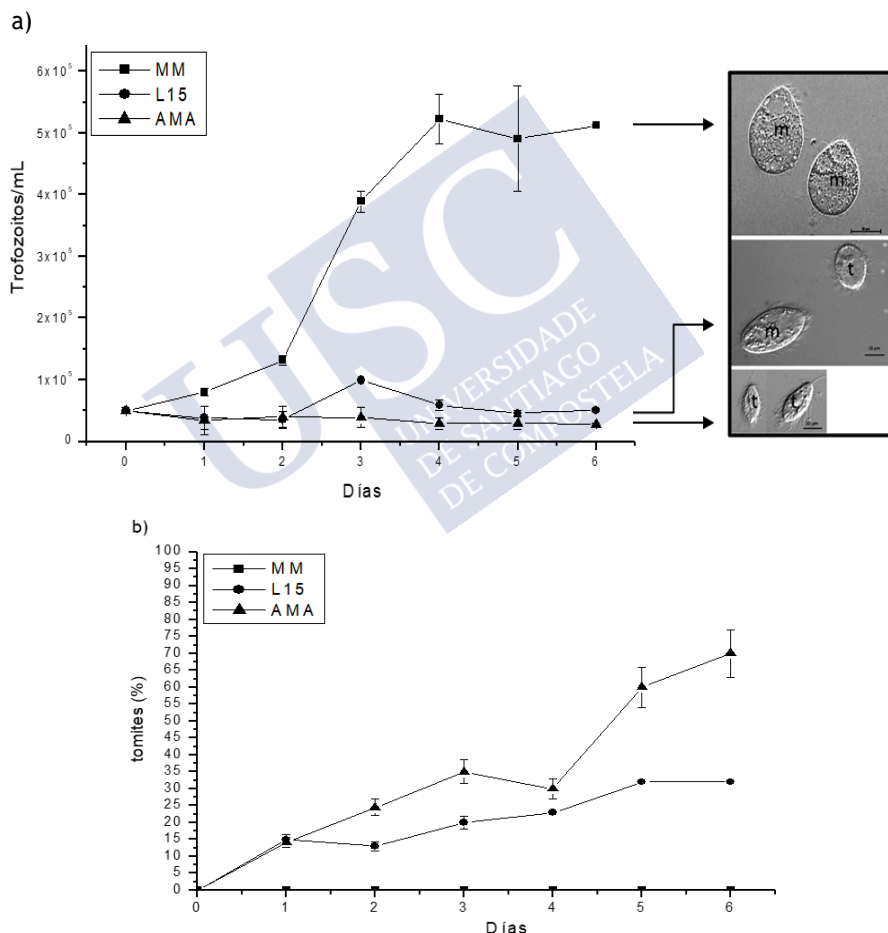


Fig. 2: A) Curva de crecimiento y B) porcentaje de tomites de la cepa I1 de *Philasterides dicentrarchi* en medio MM, en medio L-15 y en agua de mar artificial

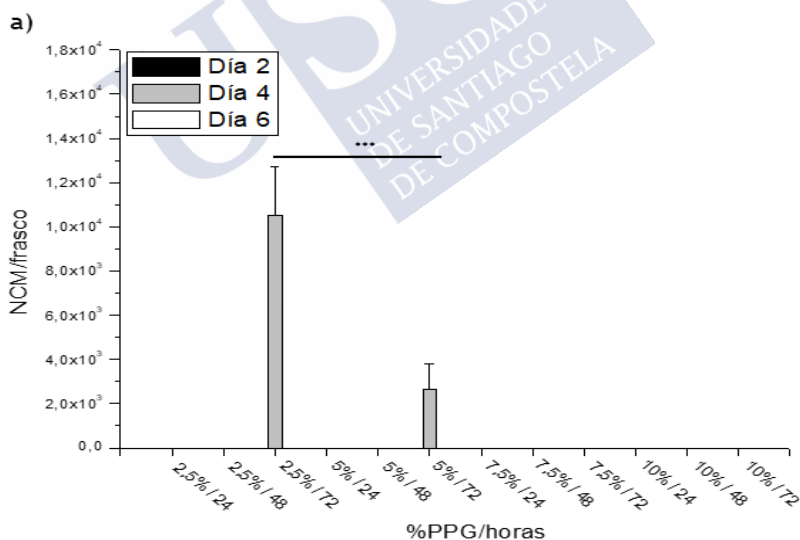
(AMA), incubados durante 6 días a 21°C. Cada punto representa el valor de la media \pm la desviación estándar de cinco recuentos. Los asteriscos indican el nivel de significación: *** $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ y * $P < 0,001$. Las fotografías realizadas al microscopio y situadas a la derecha del gráfico “a” muestran las formas microstoma (m) y tomite (t) presentes en medio MM, L15 y AMA a día 6 de cultivo.

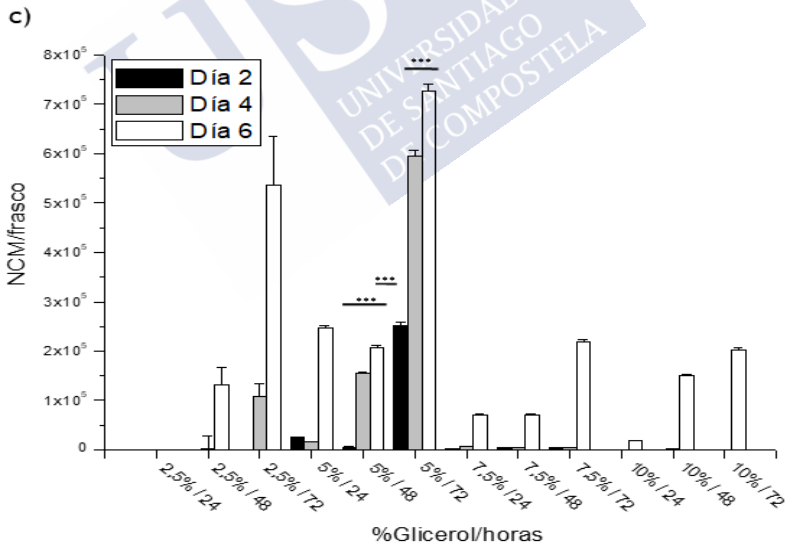
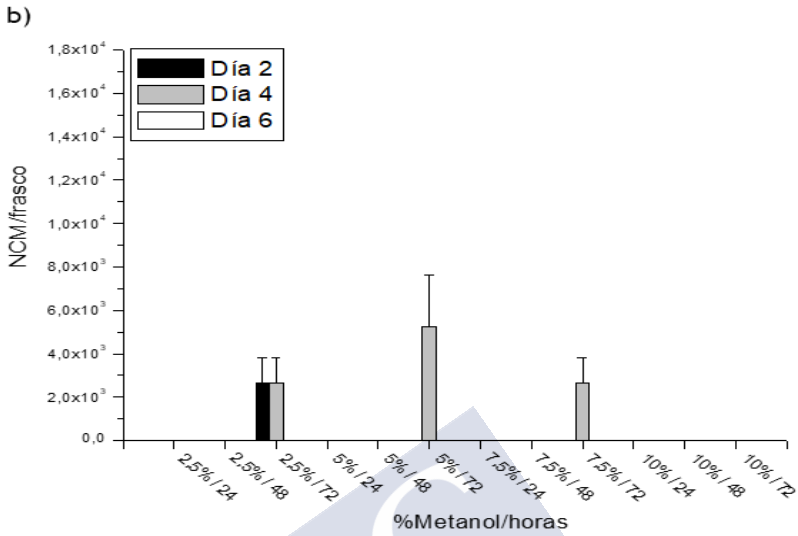
3.4.3. Pruebas con otros crioprotectores a distintas concentraciones, alternancia de medios para la congelación/descongelación y tiempo de conservación de los crioviales a -80 °C

Con el fin de descartar posibles combinaciones que diesen lugar a un mayor rendimiento en el protocolo de crioconservación, se llevaron a cabo ensayos que permitieron comparar el efecto del glicerol sobre la crioconservación frente a otros crioprotectores como el propilenglicol (PPG) y el metanol, y evaluar la eficacia de la cripreservación en función del porcentaje de DMSO utilizado.

Las concentraciones usadas tanto para el PPG como para el metanol fueron 2,5; 5; 7,5 o 10% de crioprotector en medio MM suplementado con DMSO al 11%. Para ambos compuestos, se obtuvieron los mayores porcentajes de supervivencia cuando los ciliados procedían de un cultivo a día 4. Sin embargo, para el PPG la concentración a la cual se observó un mayor número de ciliados móviles fue 2,5% (Figura 3A), mientras que para el metanol no se observaron diferencias significativas entre usarlo al 2,5, 5% o 7,5%. Cabe destacar que cuando se utilizó metanol al 2,5% también observamos ciliados móviles a día 2 de cultivo (Figura 3B). En ambos casos, tanto para el PPG como para el metanol, fue necesario esperar hasta las 72 h para observar algún parásito en movimiento. Los resultados obtenidos, en términos de supervivencia, a partir de la utilización de los dos compuestos distan mucho de los obtenidos cuando el crioprotector utilizado es glicerol (Figura 3C).

En el caso del DMSO, las concentraciones probadas fueron 2,5; 5; 11; 16 y 22% en MM suplementado con glicerol al 5%. Solo se observaron NCM/frasco cuando el compuesto se utilizó al 16 y al 11%. Para la primera de estas concentraciones, se observaron ciliados móviles ya a las 24 h tras la descongelación cuando se utilizaron ciliados procedentes de un cultivo a día 6. A las 48 h tras la descongelación, el número de ciliados móviles aumentó y también se observaron en aquellos frascos en los que los ciliados fueron criopreservados con un 11% de DMSO. A las 72 h tras la descongelación no hubo diferencias significativas en el NCM/frasco entre los que se congelaron con un 11% de DMSO y un 16% de DMSO. Cuando los ciliados utilizados procedían del día 4 de cultivo no se observó ninguna supervivencia en ninguna de las condiciones, al igual que en los ciliados procedentes de un cultivo a día 2, donde solo se observaron 2632 NCM/frasco a las 72 h al utilizar DMSO al 16% (Figura 3D).





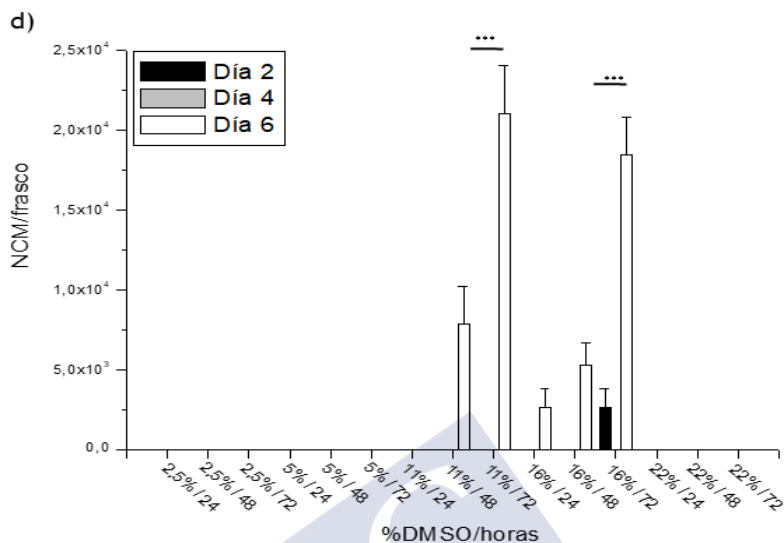


Fig. 3: Efecto del uso de diferentes crioprotectores a distintas concentraciones en la eficacia de la criopreservación en la cepa I1 de *Philasterides dicentrarchi*. Los compuestos probados fueron A) propilenglicol (PPG) y B) metanol, ambos al 2,5; 5; 7,5 o 10% en medio MM con un 11% de DMSO. La gráfica (C), representa los valores obtenidos al utilizar glicerol a las mismas concentraciones y en las mismas condiciones (control). Se probaron distintas concentraciones (2,5; 5; 11; 16 o 22%) de DMSO en medio MM con un 5% de glicerol (D). Estos ensayos se llevaron a cabo con ciliados procedentes de un cultivo a diferente fase de crecimiento (2, 4 y 6 días), siguiendo la misma metodología de crioconservación que en el ensayo anterior. Los resultados fueron expresados como el número de ciliados móviles (NCM)/frasco a 24, 48 y 72 h tras la descongelación. Estos indican el valor de las medias \pm las desviaciones estándar del NCM/frasco contados en cinco crioviales. Los asteriscos indican el nivel de significación *** $P < 0,05$.

También se utilizó FBS en la mezcla de crioconservación para analizar si el uso de este componente aumentaba de manera considerable el porcentaje de supervivencia de los escuticociliados tras la crioconservación; o bien, si los ciliados recuperaban antes la movilidad. Los trofozoitos utilizados para este ensayo procedían de un cultivo a día 6. Los mayores valores de NCM/frasco se obtuvieron a las 72 h tras la descongelación, siendo significativas las diferencias entre los valores obtenidos a 24 y 48 h, salvo en aquellos casos en los que se utilizó solo glicerol o glicerol con FBS, donde no sobrevivió ningún escuticociliado. Tres días después de la descongelación, se observó que

la combinación de DMSO y FBS no generó mejores resultados que cuando estos compuestos se utilizaron por separado en medio MM. Si lo que analizamos son los controles; es decir, medio MM suplementado con el 5% de glicerol y el 11% de DMSO, vemos que el hecho de añadir a la mezcla FBS da lugar a que haya un mayor número de NCM/frasco; sin embargo, con el análisis estadístico se observa que esta diferencia no es significativa (Figura 4).

Por otra parte, los resultados derivados de utilizar medio L-15 como medio de congelación y/o descongelación demostraron que los ciliados sobreviven al utilizar un 5% de glicerol y un 11% de DMSO en este medio. Sin embargo, los parásitos deben de ser cultivados previamente en medio MM ya que apenas se observó supervivencia de aquellos escuticociliados que habían sido cultivados los 6 días en medio L-15. Los mayores valores de NCM/frasco se obtienen a las 72 h en aquellos casos en los que los ciliados fueron congelados en MM con un 5% de glicerol y un 11% de DMSO y descongelados en medio MM.

Como se comentó anteriormente, también se observó supervivencia de los protozoos, aunque en menores niveles, cuando se utilizó solo DMSO o solo FBS para suplementar el medio MM como mezcla de crioconservación. Si se utiliza medio L-15 como medio para congelar y/o descongelar los ciliados estas tendencias se mantienen (Figura 5).

Como último parámetro a tener en cuenta, se analizó la supervivencia tras la descongelación en función del tiempo que los crioviales permanecían a -80 °C en la caja de congelación celular (CoolCell, Biocision), antes de ser almacenados en el contenedor de nitrógeno líquido. Los tiempos analizados fueron 2 h, tiempo que se utilizó para todos los ensayos precedentes, y 24 h. Para esta segunda condición no se observó supervivencia.

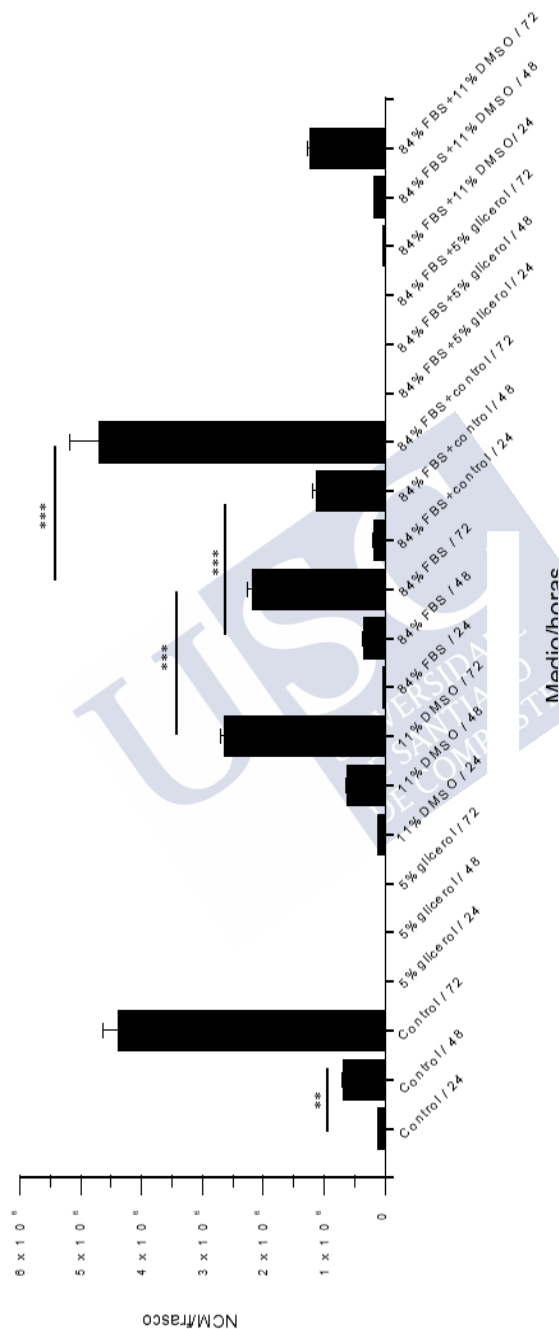


Fig. 4: : Efecto del uso de glicerol y DMSO solos o combinados en medio MM para la mezcla de crioconservación y efecto del uso de suero fetal bovino (FBS) al 84% solo o combinado con los otros dos crioprotectores en términos de supervivencia tras la descongelación en la cepa I1 de *Philasterides dicentrarchi*. Todas las mezclas de crioconservación se prepararon utilizando medio MM. Control: 5% de glicerol y 11% de DMSO en medio MM. Estos ensayos se llevaron a cabo con ciliados procedentes de un cultivo a día 6, siguiendo la misma metodología de crioconservación que en los ensayos anteriores. Los resultados fueron expresados como el número de ciliados móviles (NCM)/frasco a 24, 48 y 72 h tras la descongelación. Estos representan el valor de las medias \pm las desviaciones estándar del NCM/frasco contados en cinco crioviales. Los asteriscos indican el nivel de significación: *** $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$.

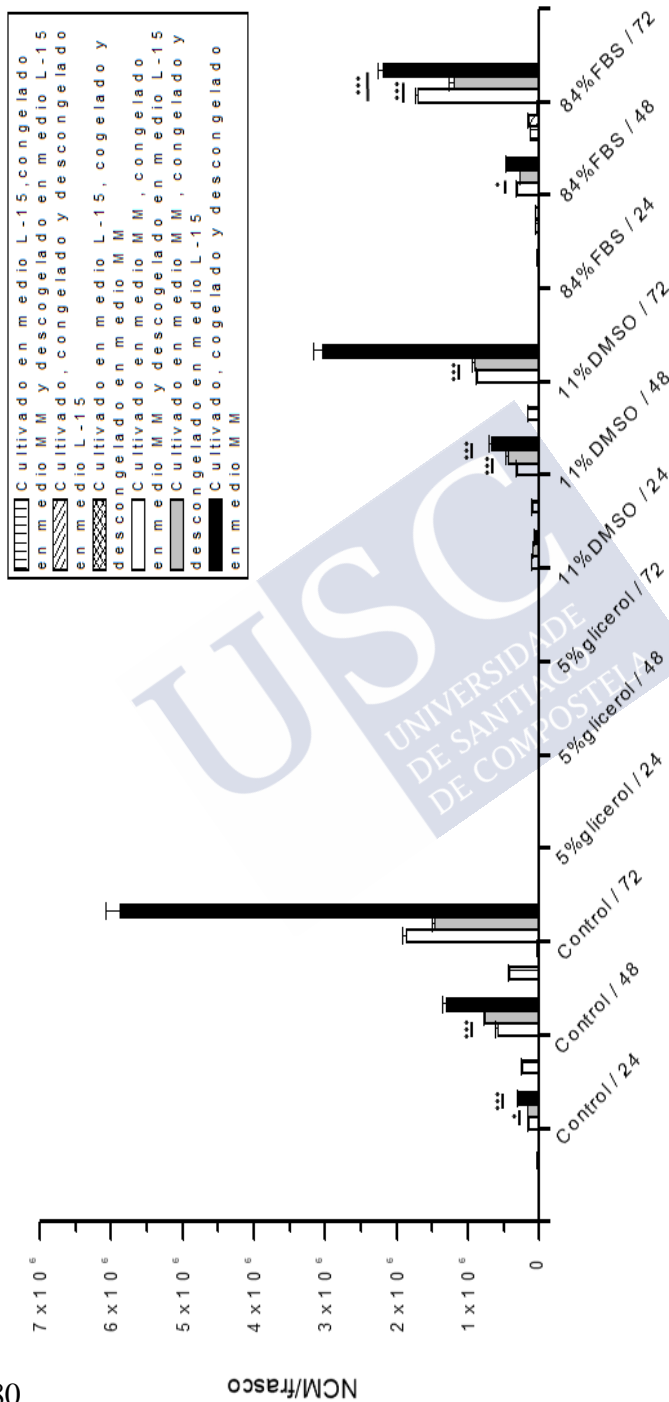


Fig. 5: Efecto del uso de medio L-15 y medio MM en el cultivo, en la congelación y en la descongelación, así como la combinación de ambos, en la eficacia de la criopreservación en la cepa I1 de *Philasterides dicentrarchi*. Se utilizaron como crioprotectores FBS al 84%, glicerol al 5%, DMSO al 11% o la combinación de estos dos últimos (Control) en el medio correspondiente. Estos ensayos se llevaron a cabo con cultivos procedentes de un cultivo a día 6, siguiendo la misma metodología de criopreservación que en los ensayos anteriores. Los resultados fueron expresados como el número de cilios móviles (NCM)/frasco a 24, 48 y 72 h tras la descongelación. Estos representan el valor de las medias \pm las desviaciones estándar del NCM/frasco contados en cinco crioviales. Los asteriscos indican el nivel de significación: *** $p < 0,05$ y * $p < 0,001$.

3.4.4. Confirmación del protocolo de crioconservación

Se llevó a cabo un diseño experimental para establecer las condiciones óptimas para la crioconservación. En nuestro caso, el análisis se desarrolló para determinar el efecto de dos factores; la concentración de glicerol como crioprotector (X_1) y el día de cultivo de los ciliados (X_2), en la viabilidad de los parásitos a 24 h tras la descongelación (Tabla 3A). Para determinar el efecto de estos factores en la viabilidad se realizó un análisis de regresión múltiple.

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó un modelo cuadrático a partir de la siguiente ecuación:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{1.2} X_1 X_2 + \beta_{1.1} (X_1)^2 + \beta_{2.2} (X_2)^2$$

Donde, β_0 , β_1 , β_2 , $\beta_{1.2}$, $\beta_{1.1}$ y $\beta_{2.2}$ son los coeficientes de regresión y X_1 y X_2 las variables independientes. Estas últimas fueron analizadas mediante una superficie de respuesta. La concentración de glicerol y el día de cultivo, así como la interacción entre ambos factores, tienen un efecto sobre la viabilidad de los ciliados con un grado de significación del 95% ($\alpha=0,05$). El valor de R^2 indica que el modelo contempla el 93,53% de la variabilidad asociada al modelo a partir de los datos de viabilidad de los ciliados tras la descongelación. Además, al aplicar el test estadístico Durbin-Watson se observó una autocorrelación de las variables independientes de 1,6 ($P<0,05$) (Tabla 3B).

Así, el análisis de regresión múltiple queda sujeto a la siguiente ecuación:

$$\text{Viabilidad} = 1,00 - 6,17 X_1 + 17 X_2 - 8,75 X_1 X_2 + 16 (X_2)^2$$

Gracias a esta fórmula, el efecto de las dos variables independientes sobre la viabilidad fue representada en un gráfico como superficie de respuesta usando los coeficientes de regresión de la ecuación, los cuales fueron escalados y centrados. Después del análisis de la superficie de respuesta obtenida se observó que la viabilidad de los parásitos aumenta cuando se incrementa el tiempo de cultivo y disminuye cuanto mayor es el porcentaje de glicerol (Figura 6).

a)

X_1	X_2	Glicerol (%)	Fase de cultivo (Día)	Viabilidad (%)
-1.0	-1.0	5	2	2,63
0.0	0.0	7,5	4	0,79
0.0	-1.0	7,5	2	1,11
1.0	-1.0	10	2	0,00
0.0	0.0	7,5	4	0,89
1.0	0.0	10	4	0,00
0.0	1.0	7,5	6	7,11
1.0	1.0	10	6	1,84
-1.0	0.0	5	4	1,58
-1.0	1.0	5	6	24,74

b)

Variable independiente	Coefficiente	P valor
Constante	-0,05	
X_1	-4,52	0,0459*
X_2	4,99	0,0341*
$(X_1)^2$	1,78	0,5210
$X_1 \cdot X_2$	-5,07	0,0588
$(X_2)^2$	5,10	0,1143

R^2 (%) = 73,6947
Estadístico Durbin-Watson = 2,4798 (P = 0,7649)

Tabla 3: Optimización del protocolo de criopreservación. A) Variables independientes, con sus valores codificados para el modelo (X_1 , X_2), y el porcentaje de viabilidad de los ciliados alcanzados a 24 horas tras la descongelación. B) Coeficientes de determinación, R^2 , análisis de regresión múltiple Durbin-Watson y nivel de significación para el análisis de la varianza (P) (* $P < 0,05$).

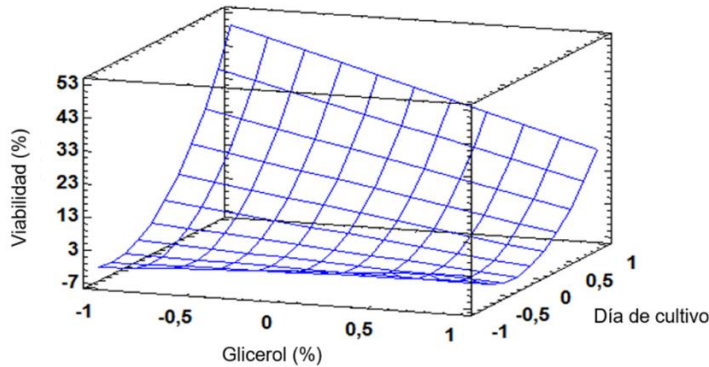


Fig. 6: Gráfico de la superficie de respuesta que relaciona el efecto (en valores codificados) de la concentración de glicerol (%) y el día de cultivo con la viabilidad de los ciliados 24 horas después de la descongelación.

3.4.5. Aplicación del método de crioconservación para otras cepas de *Philasterides dicentrarchi* y *Miamiensis avidus*

Una vez que el protocolo de criopreservación fue optimizado en la cepa I1 de *Philasterides dicentrarchi* se probó su eficacia en otras cepas de las especies *Philasterides dicentrarchi* y *Miamiensis avidus*. En primer lugar, se determinó el crecimiento de todas las cepas en medio MM durante 6 días de cultivo.

La fase estacionaria se alcanza a partir del día 3 para todas las cepas. Para una mayor eficacia de la crioconservación los ciliados deben de estar en fase estacionaria, por lo que se utilizaron a día 6 de cultivo para la congelación. Como se observa en la Tabla 4, todas las cepas conservaron ciliados viables tras la descongelación. La cepa cuyos protozoos recobraron antes la movilidad fue *M. avidus* (Ma/2) (a las pocas horas tras la descongelación) seguida de las cepas C1, D3 e I1 (a 24h tras la descongelación, y por B1 y D2 (a 48h tras la descongelación) de *Philasterides dicentrarchi*. En los cultivos de las cepas *Miamiensis sp.* (Ma) y Pe7 se observaron ciliados en movimiento 3 días tras la descongelación y en las cepas Pe5 y Po a día 4, siendo estas las más tardías a la hora de recuperar la movilidad (Tabla 4).

Cepas	Ciliados móviles tras la descongelación (Días)				
	0	1	2	3	4
B1			+		
C1		+			
D2			+		
D3		+			
I1		+			
Ma				+	
Ma/2	+				
Pe5					+
Pe7				+	
Po					+

Tabla 4: Día de supervivencia después de la descongelación de las distintas cepas de *Philasterides dicentrarchi* (B1, C1, D2, D3, I1, Pe5, Pe7, P0), *Miamiensis avidus* (cepa Ma/2) y *Miamiensis sp.* (cepa Ma) criopreservados en medio MM suplementado con DMSO al 11% y glicerol al 5%. Los símbolos (+) indica la presencia de ciliados móviles al día de descongelación.

3.4.6. Conservación de la virulencia tras la criopreservación

A partir de los ensayos de infección se observó que los ciliados de la cepa I1 de *P. dicentrarchi* que permanecieron en cultivo y aquellos que fueron cultivados tras la descongelación fueron virulentos para el rodaballo y mostraron el mismo grado de virulencia, sin mostrar diferencias significativas entre ambos grupos (Figura 7).

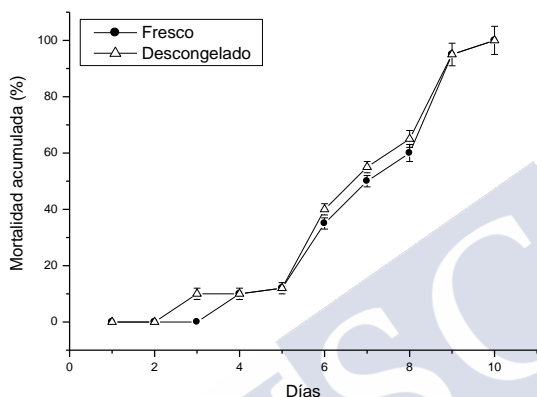


Fig. 7: Curva de mortalidad obtenida tras la infección experimental de rodaballos inoculados intraperitonealmente con 5×10^5 ciliados procedentes de cultivo (frescos) y ciliados criopreservados (descongelados). Los valores representados muestran el porcentaje de mortalidad observada durante los diez días siguientes a la infección.

3.4.7. Comparación entre el protocolo de criopreservación desarrollado con otros usados para la criopreservación en *Miamiensis avidus*

Se comparó, en términos de recuperación, el protocolo de criopreservación descrito con otro usado por la ATCC para las cepas Ma de *Miamiensis sp.* (ATCC® 50179™; https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/50179.aspx?geo_country=es) y Ma/2 de *M. avidus* (ATCC® 50180™; <https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/50180.aspx>).

Ambos protocolos son similares, pero difieren en el tipo de criopreservante, ya que el descrito en la ATCC utiliza metanol en lugar de glicerol. El uso de este último incrementa la supervivencia en ambas cepas. Además, utilizando glicerol se obtiene una mayor viabilidad partiendo de una menor concentración inicial de ciliados (Tabla 5).

Número ciliados / criovial	<i>Miamiensis avidus</i> cepa Ma/2	
	Glicerol (5%) + DMSO (11%)	Metanol (5%) + DMSO (11%)
	NCM/frasco	
1x10 ⁶	746,215 ± 72,185	529,230 ± 29,320
20x10 ⁶	731 ± 31,230	710,545 ± 60,450
40x10 ⁶	18,655 ± 2,650	2,105 ± 1,985
	<i>Miamiensis avidus</i> cepa Ma	
	Glicerol (5%) + DMSO (11%)	Metanol (5%) + DMSO (11%)
	NCM/frasco	
1x10 ⁶	1,580 ± 905	0*
20x10 ⁶	575 ± 510	0*
40x10 ⁶	0*	0**

Tabla 5: Supervivencia de trofozoitos de las cepas Ma/2 y Ma de *Miamiensis avidus* de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), criopreservadas en dos medios de criopreservación que contenían glicerol al 5% y metanol al 5% como agentes crioprotectores, respectivamente. Los ciliados se criopreservaron a diferentes concentraciones (número ciliado/criovial) y la supervivencia fue calculada por el número de ciliados móviles (NCM/frasco) a 72 horas tras la descongelación. Los valores representan la media ± la desviación estándar de cinco recuentos. Los asteriscos indican la presencia de ciliados móviles a 98 h (*) y a 146 h (**) después la descongelación.

3.5. DISCUSIÓN

Existen un alto número de factores que afectan a la eficacia de la criopreservación en microorganismos, incluyendo la especie, la cepa, el tamaño y forma celular, la etapa de crecimiento, la temperatura de incubación, la composición del medio de cultivo, el pH, la osmolaridad, el contenido celular en agua, el contenido lipídico y la composición celular, la composición del medio de congelación, el proceso de congelación y descongelación, la temperatura y el tiempo de almacenamiento, y el medio de recuperación (Hubálek, 2003).

Debido a esta gran cantidad de parámetros, para desarrollar un protocolo de criopreservación óptimo y de máximas garantías para un cierto organismo o especie es necesario llevar a cabo ensayos mediante

los cuales todas estas variables puedan ser analizadas tanto de manera individual como combinada.

En nuestro caso, se llevaron a cabo un total de cinco ensayos independientes que permitieron determinar la concentración inicial de ciliados, el medio de cultivo, los componentes del medio de crioconservación, el porcentaje de crioprotectores y el medio de descongelación óptimos para desarrollar una metodología de congelación y descongelación que permita crioconservar ciliados de la especie *Philasterides dicentrarchi* y del género *Miamiensis* de forma reproducible, segura y eficaz.

El primer paso fue determinar la concentración inicial de ciliados/criovial. Para ello, se utilizaron solamente parásitos procedentes de un cultivo a día 2. Como demuestra el modelo de predicción y los resultados posteriormente obtenidos, el día óptimo de cultivo para llevar a cabo la crioconservación es el día 6 por lo que los valores de NCM/frasco obtenidos a día 2 de cultivo no fueron los más elevados; sin embargo, los resultados fueron suficientes para descartar las otras concentraciones de ciliados/criovial usadas y considerar que la mejor opción era partir de 5×10^5 ciliados/criovial para todos los ensayos.

El segundo factor a tener en cuenta fue uno de los que más afecta a la eficacia de la criopreservación. Se trata del tipo de medio usado durante el proceso de congelación. Según numerosos autores, por lo general el medio de congelación debería de ser siempre el medio en el que crecen las células (Miyake et al., 2004). En nuestro caso, los ciliados pueden ser cultivados en agua de mar, medio L-15 o medio MM, siendo este último con el que se observan unos mayores niveles de crecimiento. Del mismo modo, para la crioconservación, el medio MM es el que mejores resultados permite en términos de supervivencia tras la descongelación, seguramente debido a su alto contenido en agentes crioprotectores como la peptona (Soldo y Merlin, 1972). El medio L-15 es utilizado extensivamente como medio de cultivo para estos parásitos; sin embargo, la recuperación de los ciliados en medio L-15 fue más baja que en los de medio MM. Las pruebas llevadas a

cabo con medio L-15 han demostrado que este medio puede ser utilizado para congelar ciliados cuando está suplementado con glicerol al 5% y DMSO al 11%, o incluso ser utilizado como medio de cultivo tras la descongelación, tanto si se ha usado medio L-15 como medio MM como medio de congelación. Sin embargo, y aunque se observe supervivencia en estas condiciones, los valores distan mucho de los obtenidos cuando el medio utilizado tanto para el cultivo pre y post congelación es el medio MM.

Para que el proceso de crioconservación sea efectivo es necesario que el medio de congelación contenga agentes crioprotectores que protejan al organismo cuando este se expone a las ultra bajas temperaturas. Diferentes estudios avalan la importancia de distintos compuestos como agentes crioprotectores, los cuales incrementan la eficacia de la criopreservación (Miyake et al., 2004). De estos, los que mejor resultados han generado han sido DMSO, glicerol, suero sanguíneo o seroalbúmina, leche descremada, peptona, extracto de levadura, sacarosa, glucosa, metanol, polivinilpirrolidona, sorbitol y extracto de malta (Hubálek, 2003); siendo el DMSO y el glicerol los más eficaces en parásitos (Miyake et al., 2004). En algunos casos, como en *Uronema marinum*, el DMSO puede generar toxicidad (Anderson et al., 2009). Este compuesto es el más ampliamente utilizado como agente crioprotector y puede ser usado para congelar la mayoría de las especies de protozoos (Walker y Ashwood-Smith, 1961). La concentración de DMSO empleada depende de la cepa y puede variar entre un 2,5% y un 12,5%, aunque en algunas especies de escuticociliados el rango se amplía hasta 9-11% (Nerad y Daggett, 1992). El glicerol es, junto con el DMSO, el otro agente crioprotector más utilizado en microbiología y fue utilizado para crioconservación por primera vez por Fulton y Smith (1953) a distintas concentraciones (2-55%) (Miyata, 1975). La combinación de crioprotectores, como DMSO y glicerol, ha sido también ampliamente usada en las mezclas de crioconservación de microorganismos y parásitos (Miyake et al., 2004; Tavassoli et al., 2009; Narduche et al., 2016).

Debido al amplio uso de estos dos compuestos decidimos probarlos como agentes crioprotectores para la crioconservación de la cepa I1 de

Philasterides dicentrarchi. La combinación que se utilizó desde un principio en nuestros ensayos fue de un 5% de glicerol y un 11% de DMSO. Sin embargo, con el fin de mejorar la eficacia del protocolo de criopreservación, se llevaron a cabo ensayos en los que se probaron distintas concentraciones de glicerol combinado con DMSO al 11% y ensayos en los que se probaron distintas concentraciones de DMSO combinado con glicerol al 5%. El hecho de utilizar solo glicerol no generó ninguna supervivencia y cuando se utilizó solo DMSO generó una supervivencia más baja que al combinar ambos. Para el glicerol, se alcanzaron los mayores valores de NCM/frasco cuando este fue utilizado al 5%, tanto en medio MM, como L-15 y AMA; así como a día 2, 4 y 6 de cultivo. Para el DMSO, el uso a concentraciones muy bajas (2,5 y 5%) no permitió que el compuesto actuase como crioprotector ya que a estos porcentajes no sobrevivió ningún ciliado. Del mismo modo, el uso de este compuesto al 22% resultó nocivo para los parásitos ya que tampoco se observó supervivencia. A las 24 horas solo se observaron escuticociliados en movimiento cuando el porcentaje de DMSO fue del 16%. Sin embargo, a las 48 horas también se observaron ciliados móviles que fueron congelados con el 11% de DMSO y, a las 72 horas, el porcentaje de supervivencia era mayor cuando se usó DMSO al 11% con respecto al 16%, aunque al realizar el análisis estadístico se observó que las diferencias no eran significativas entre estos dos grupos.

Existe una teoría clásica que aboga por que la crioconservación de cualquier tipo de célula debe de llevarse a cabo cuando esta se encuentra en la fase logarítmica o exponencial de su crecimiento, momento en el que las células presentan un menor tamaño, menor vacuolización y predominio del citoplasma; lo que resultan condiciones óptimas para la supervivencia si se usan protocolos tradicionales de criopreservación basados en una lenta congelación (Suguwara et al., 1974; Withers y Street, 1977; Day, 2004). Sin embargo, hay distintos estudios que rechazan esta teoría y que concluyen que la fase óptima de cultivo para la crioconservación varía en función de la especie, lo que requiere una investigación específica para cada tipo de célula (Ishikawa et al., 2006). Aunque, a partir de los ensayos realizados y descritos anteriormente,

obtuvimos ciliados viables después de la congelación cuando estos provenían de un cultivo en fase logarítmica, los mayores valores de supervivencia se alcanzaron a partir de ciliados cuya fase de crecimiento era estacionaria en medio MM (día 6 de cultivo). Para los cultivos en agua de mar, la máxima viabilidad se obtuvo al utilizar ciliados a pocos días de ser cultivados, donde los protozoos ya estaban en fase estacionaria debido a que la pobreza en nutrientes del medio impide que se alcance una fase de crecimiento exponencial. *P. dicentrarchi* presenta durante su ciclo biológico las formas de microstomas y tomites (De Felipe et al., 2017). Estas últimas, las cuales son consideradas como formas de resistencia (inanición, criptobiosis), aumentan bajo condiciones de cultivo desfavorables como la escasez de nutrientes (ej en agua de mar), la presencia de sustancias o compuestos nocivos o en fases avanzadas de cultivo durante la fase estacionaria (Moraes et al., 2009). Los ensayos realizados muestran que ambas formas celulares presentes en el ciclo de *P. dicentrarchi* resisten la criopreservación. Resultados similares fueron obtenidos en la criopreservación de tomites y terontes del ciliado parásito *I. multifiliis* (Everett et al., 2002).

Los tres factores que se han comentado hasta el momento (medio de cultivo, crioprotectores y fase de cultivo) suponen parámetros fundamentales del proceso de criopreservación. La eficacia del proceso de criopreservación hace necesario que en la mayoría de los casos se lleve a cabo una optimización previa del protocolo de criopreservación específica para cada tipo de célula o microorganismo (Nsabimana et al., 2003; Miyake et al., 2004; Baust et al., 2009; Mzabi et al., 2015). Ensayos de optimización mediante el uso de diseños factoriales han sido utilizados en estudios de criopreservación para plantear experimentos e identificar qué factores son importantes para determinar la viabilidad celular (Babiak et al., 2000; Maas et al., 2000). En el presente protocolo se analizó la influencia de factores como el crioprotector y la fase de cultivo de los ciliados en la criopreservación de protozoos de la cepa I1 de *P. dicentrarchi* con el fin de optimizarlo y, posteriormente, extrapolarlo a otras cepas de la misma especie y a cepas del género *Miamiensis*. El análisis de regresión múltiple reveló

que el factor que genera una mayor influencia a la hora de obtener ciliados viables tras la congelación es la fase de cultivo, siendo la fase estacionaria aquella que da lugar a mejores resultados; como ya se había observado anteriormente en otros organismos (Ishikawa et al., 2006).

En este punto, para obtener más datos que permitiesen diferentes variaciones del protocolo de crioconservación y con el fin de optimizar los resultados, se probaron otros crioprotectores; además de evaluar el efecto de usar distintos medios para la congelación y la descongelación, así como el tiempo que los crioviales se incubaban a -80 °C.

El propilenglicol (PPG) ha sido otro compuesto usado como crioprotector; sin embargo, ha dado lugar a una cierta controversia ya que su uso no siempre ha generado buenos resultados. Muchos son los autores que han comparado los efectos del PPG con el metanol como crioprotector. En la crioconservación de esperma del bivalvo *Mesodesma donacium* se obtuvieron mejores resultados usando PPG en comparación con metanol (60% de supervivencia frente a un 30% de supervivencia, respectivamente) (Dupré et al., 2006), en la criopreservación de espermatozoides de yamú (*Brycon amazonicus*) las tasas de supervivencia obtenidas con PPG fueron equiparables a las obtenidas con metanol a la misma concentración (Cruz et al., 2006) y en la crioconservación de esperma de anchoa peruana (*Engraulis ringens*) los porcentajes de supervivencia fueron inferiores que cuando se usó metanol (Catcoparco et al., 2010). En nuestro caso, el uso PPG, a una concentración del 2,5% en MM combinado con un 11% de DMSO, permitía la crioconservación de ciliados procedentes de un cultivo a día 4 con un bajo porcentaje de supervivencia. Estos valores fueron todavía inferiores al utilizar metanol como crioprotector. Tanto los resultados obtenidos a partir del PPG como del metanol difieren mucho de los obtenidos al utilizar glicerol como medio de crioconservación, donde el NCM/frasco es casi diez veces superior.

También se ha visto que el hecho de añadir FBS o no a la mezcla de criopreservación puede tener efecto sobre la supervivencia, ya que el número de ciliados móviles aumenta en un 6,8% al utilizar FBS al 84% junto con el 5% de glicerol y el 11% de DMSO. Resultados

similares fueron obtenidos por Marco-Jiménez en 2006, cuando comparaba el efecto de añadir FBS (25%) o no a mezclas de crioconservación con DMSO o metanol (10%) sobre la supervivencia tras la congelación de espermatozoides de anguila europea (*Anguilla anguilla*). La influencia positiva del FBS puede deberse a las proteínas séricas y a los lípidos, los cuales pueden desempeñar un papel importante en el proceso de crioconservación como mecanismo de defensa en la inestabilidad de la membrana plasmática (Watson, 1995). Es posible, por tanto, que la protección mecánica a nivel de membrana sea proporcionada por el FBS, permitiendo que las estructuras internas de las células estén en buenas condiciones para ser reactivadas después de la congelación (Garzón et al., 2008). Sin embargo, en nuestro caso, el hecho de añadir FBS a la mezcla de crioconservación no mejoró significativamente los resultados.

Otra variable que se analizó para ver el efecto sobre la supervivencia tras la descongelación fue el tiempo que se mantenían los ciliados a -80°C en la caja de congelación celular (CoolCell, Biocision) antes de ser pasados al contenedor de nitrógeno líquido. Todos los ensayos se llevaron a cabo manteniendo los ciliados durante 2 horas a -80°C , ya que el sistema permite que la temperatura baje en el interior de la caja $-1^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ y en 120 minutos se alcanzarían los -100°C si tenemos en cuenta unos 20°C de temperatura ambiente en el laboratorio. Este tiempo es suficiente para que los ciliados resistan el posterior cambio a los -140°C a los que se encuentra el nitrógeno líquido. Sin embargo, si dejamos a los ciliados en la caja de congelación celular 24 horas los ciliados no sobreviven ya que a -80°C no se produce la crioconservación y todo el tiempo que pasan a esa temperatura hace que los ciliados se mueran.

También se han descrito diferencias en cuanto a la sensibilidad de distintos tipos de células frente a la crioconservación (Van Buskirk et al., 2004). Siguiendo la misma metodología de criopreservación y descongelación, hemos observado diferencias en el tiempo de recuperación de la movilidad de los ciliados entre cepas tras la crioconservación; hecho similar ya descrito en otros parásitos en 2015

por Mzabi. Budiño en 2012 observó que había diferencias antigénicas entre varios aislados y diferencias en cuanto al grado de protección frente a los mismos. Además, los aislados D2 y D3 de la especie *Philasterides dicentrarchi* mostraban diferencias a nivel génico, serológico y de virulencia a la actividad del complemento. Estas diferencias hacen pensar que existen otras a distintos niveles biológicos que hacen que las cepas tarden más o menos en recuperarse tras la descongelación.

El mantenimiento de los parásitos en cultivos activos mediante la infección de peces resulta una ardua tarea, pero el mantenimiento de los ciliados en cultivo durante periodos de tiempo, sin ser estos pasados periódicamente por rodaballo, da lugar a la pérdida de la virulencia de los protozoos (Iglesias et al., 2003a). La crioconservación de ciliados virulentos, tras ser aislados de peces infectados, permite almacenar parásitos que mantengan la virulencia durante largos periodos de tiempo, evitando así la necesidad de infectar rodaballos periódicamente y la pérdida de la virulencia por la subcultivación. El mantenimiento de la virulencia de otros parásitos tras la descongelación ha sido recogido por otros autores que utilizaban como agente crioprotector DMSO al 20% (De Rezende et al., 2015).

Para la crioconservación de algunos microorganismos, incluidos algas rojas y protozoos, el metanol, como agente crioprotector, resulta tan eficaz como el DMSO o el glicerol (Hubález, 2003; Ohnuma et al., 2011), oscilando entre el 2% y el 10% la concentración más utilizada (Gäbler-Schwarz et al., 2013). Para la criopreservación de las cepas Ma y Ma/2 de *Miamiensis* hemos visto que los mejores resultados de viabilidad se obtienen al utilizar como agentes crioprotectores DMSO al 11% y glicerol al 5% en medio MM; siendo mejores incluso que los obtenidos a partir del protocolo de crioconservación de la ATCC (<https://www.atcc.org/products/all/50180.aspx>), donde se utiliza metanol y, además, es necesaria una mayor concentración de inicial de ciliados.

Por lo tanto, el protocolo de crioconservación desarrollado presenta una alta eficacia en términos de viabilidad de ciliados de las cepas de

Philasterides dicentrarchi y otras cepas de escuticociliados, confirmándose además que la fase de cultivo en la que se encuentran los ciliados es un factor clave; siendo el día 6 de cultivo la etapa óptima. La combinación de DMSO al 11% y glicerol al 5% en medio MM resultó ser aquella que generaba una mayor supervivencia tras la descongelación y, por lo tanto, la mejor combinación para la crioconservación en la cepa I1 de *P. dicentrarchi*; siendo el medio MM el medio óptimo para el cultivo de los ciliados tras la descongelación. Ha quedado demostrado también que los ciliados mantienen la patogenicidad tras la etapa de congelación, lo que permite consérvalos durante largos periodos de tiempo sin necesidad de realizar infecciones periódicas en rodaballo para que los parásitos recobren la virulencia perdida durante las sucesivas subcultivaciones. Por tanto, los ciliados crioconservados pueden ser usados en ensayos de vacunación y diagnóstico o en inmunoensayos; así como en el estudio de mecanismos de evasión o defensa, sin que se den posibles cambios debido al estado del cultivo.



Capítulo 4

IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL ENZIMA SUPERÓXIDO DISMUTASA (SOD) Y SU PAPEL FISIOLÓGICO EN EL ESTRÉS OXIDATIVO

4.1. RESUMEN

Tanto en la fase de vida libre como en la fase parasitaria, *P. dicentrarchi* está expuesto a factores ambientales o a la respuesta inmunitaria del pez, en las que se generan especies reactivas de oxígeno (ROS) que el ciliado necesita neutralizar para su supervivencia. En el presente estudio se han identificado metaloenzimas con actividad superóxido dismutasa (SOD) capaces de inactivar los aniones superóxido (O_2^-) generados en los procesos de estrés oxidativo. *P. dicentrarchi* posee los tres tipos de isoenzimas características de las SODs en eucariotas: cobre / zinc-SOD, manganeso-SOD y hierro-SOD. La isoenzima Cu/ZnSOD comprende tres tipos de proteínas homodiméricas (Pd-Cu/ZnSOD1-3) con secuencias de aminoácidos muy diferentes y con pesos moleculares entre 34 y 44 kDa. Todas las Cu/ZnSODs son sensibles a NaCN y se localizan en el citosol y en el espacio de los sacos alveolares, siendo la Pd-Cu/ZnSOD2 extracelular. Las SODs dependientes de Mn y Fe en su estado nativo son proteínas homodiméricas: a) la forma MnSOD tiene un peso molecular de 50 kDa, es insensible a H_2O_2 y NaN_3 y está ubicada en la matriz mitocondrial, y b) la forma FeSOD tiene un peso molecular de 60 kDa, es sensible a H_2O_2 , NaN_3 y al polifenol trans-resveratrol (RESV), y, aunque su producción es citosólica, también puede ser extracelular. Todas las isoenzimas de la SOD aumentan su expresión cuando la producción de O_2 se induce por radiación ultravioleta (UV), estando relacionado con la dosis de energía aplicada. Esto indica que estas enzimas están involucradas en la protección celular frente al estrés

oxidativo. Por ello, y teniendo en cuenta que estas metaloenzimas son muy diferentes a las del rodaballo, las SOD de *P. dicentrarchi* podrían representar una diana terapéutica importante para el desarrollo de fármacos inhibidores y para la generación de vacunas contra las formas extracelulares de la enzima.

4.2. INTRODUCCIÓN

Los escuticociliados son, típicamente, organismos micrófagos muy abundantes en lagos y hábitats eutróficos marinos. Se encuentran, normalmente, acumulados en sedimentos blandos y son comunes en aguas profundas en la oxiclina, mostrando una gran adaptación a ambientes con bajos niveles de oxígeno disuelto (Fenchel, 1968; Beaver y Crisman, 1982; Fenchel et al., 1990; Dolan, 1991). Como ya se ha comentado anteriormente, *Philasterides dicentrarchi* es un escuticociliado de vida libre que puede transformarse en un parásito oportunista (Dragesco et al., 1995) llegando a infectar peces de cultivo generando altos niveles de mortalidad (Iglesias et al., 2001; De Felipe et al., 2017). Al igual que otros ciliados microaerófilos, puede sobrevivir y permanecer viable en condiciones con niveles bajos de oxígeno o después del tratamiento con cianuro. Esta adaptación facilita la supervivencia del ciliado en el ambiente anóxico interno del hospedador, lo que representa la primera línea de adaptación al parasitismo de este ciliado (Morais et al., 2012).

Durante la fase endoparasitaria de la infección, las células del sistema inmunitario innato del rodaballo generan productos tóxicos, incluidas las especies reactivas de oxígeno (ROS) como el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y los radicales hidroxilo (OH), los cuales pueden ser neutralizados por el ciliado gracias a varias enzimas antioxidantes intracelulares como la glutatión peroxidasa, la catalasa o la superóxido dismutasa (Lamas et al., 2009, Sattin et al., 2015; Ferro et al., 2017; Ferro et al., 2018). Además, la exposición de los organismos acuáticos, incluidos los protozoos, a situaciones ambientales de estrés térmico, radiación ultravioleta (UV, 280-400 nm) o contaminación da lugar a un aumento significativo de las concentraciones celulares de ROS (Lesser, 1996; 2006). Se ha visto

que la actividad de la SOD aumenta después de la exposición de las diatomeas a variaciones en la irradiación, incluida la radiación UV, lo que reduce el estrés oxidativo (Rijstenbil et al., 2008). En eucariotas, las enzimas SOD se agrupan en familias en función de la presencia de diferentes cofactores metálicos (Mn / Fe, Fe y Cu / Zn) en el sitio activo de la enzima, encontrándose en diferentes compartimentos celulares (Alscher et al., 2002). Muchos eucariotas y algunos protistas microaerobios o microaerofílicos presentan SODs extracelulares (Fattman et al., 2003; Marin et al.; 2006). Más concretamente, en ciliados de las especies *Euplotes*, *Tetrahymena* o *Strombidium*, algunos tipos de SODs de la familia Cu/Zn-SOD han sido identificadas y caracterizadas, llegando a confirmarse la presencia de Mn-SODs y Fe/Mn-SODs (Santoferrara et al., 2014; Ferro et al, 2015; Kim et al., 2018; Pischedda et al., 2018).

En el presente trabajo realizamos la caracterización bioquímica y molecular de enzimas con actividad superóxido dismutasa presentes en el escuticociado *P. dicentrarchi*, prestando especial atención a la regulación de su expresión en condiciones de estrés oxidativo.

4.3. MATERIALES Y MÉTODOS

4.3.1. Purificación de SODs por cromatografía de intercambio iónico

Ciliados de la cepa I1 de *P. dicentrarchi* se lisaron por ultrasonidos en un sonicador Branson W-250 (Branson Ultrasonic Corporation, EE. UU.) (Iglesias et al., 2003a). Posteriormente, se dializó el sobrenadante frente al tampón de la cromatografía de intercambio iónico (Tris-HCl 20 mM, pH 8.0; filtrado a través de un filtro de 0,45 µm). Utilizando 1 ml de muestra, se llevó a cabo una cromatografía con una columna HiTrapQ de intercambio iónico siguiendo un protocolo automático integrado en el sistema Äktaprime plus (GE Healthcare, Suecia). Para la elución se utilizó un tampón que contenía Tris-HCl 20 mM, pH 8.0 y NaCl 1,0 M. La muestra eluida se recogió en fracciones de 2 ml, agrupándose posteriormente aquellas fracciones asociadas con los picos de absorbancia a 280 nm. Por último, se dializó frente a agua destilada, se liofilizó y se almacenó la muestra a -20 °C.

4.3.2. Determinación de la actividad de SOD en geles de poliacrilamida

La actividad SOD se analizó en geles de poliacrilamida (PAGE) siguiendo el método de Weydert y Cullen (2010).

Los ciliados se cultivaron a una concentración de 5×10^5 trofozoitos/ml en placas de cultivo de 24 pocillos (Corning, EE. UU.) y se mantuvieron en condiciones de normoxia con o sin tratamientos con inhibidores como describe previamente De Felipe (2018). Después de la incubación, durante 30 minutos con los inhibidores a una concentración de 100 μ M (H_2O_2 , KCN, NaN_3 y resveratrol (RESV)), las muestras de ciliados se recogieron mediante centrifugación y se lavaron dos veces en medio incompleto L-15 (medio sin suero bovino). A continuación, los ciliados se resuspendieron en un tampón de carga que contenía Tris-HCl 1,5 M pH 6.8; glicerol al 50% y azul de bromofenol al 5%, lo que provocó la lisis de los ciliados por choque osmótico. En algunos experimentos, se utilizaron muestras liofilizadas de la separación por cromatografía de intercambio iónico resuspendidas en tampón de carga. La determinación de la actividad enzimática en las muestras se llevó a cabo en PAGE nativo formado por gel concentrador de poliacrilamida al 5% en tampón Tris-HCl 1,5 M pH 6.8 y un gel separador al 12,5% en tampón Tris-HCl 1,5M pH 8.8. La polimerización de los geles se llevó a cabo después de la adición de persulfato de amonio al 0,04% (APS) y tetrametiletilendiamina (TEMED) al 0,0005%. Después de la polimerización del gel, se realizó una pre-electroforesis durante 1 hora a 20 mA en un tampón que contenía Tris-HCl 200 mM pH 8.8 y Na_2EDTA 0,7 mM a 4 °C, para eliminar los restos de APS remanentes en el gel que pudiesen inactivar la enzima. Una vez finalizada la pre-electroforesis, se eliminó todo el tampón inicial y la electroforesis final se llevó a cabo en un tampón que contenía Tris-HCl 50 mM pH 8.3; Na_2EDTA 1,5 mM y glicina 0,3 M durante 1,5 h a 50 mA. Posteriormente, los geles se lavaron dos veces en agua destilada y se tiñeron en una solución de nitroazul de tetrazolio (NBT: NBT 2,43 M; TEMED 28 mM; riboflavin-5'-fosfato 0,14 M) durante 20 min, en agitación y a temperatura ambiente. A continuación,

los geles se lavaron dos veces con agua destilada y se expusieron a la luz durante 12 h. La presencia de actividad enzimática se observó por la aparición de bandas de decoloración en el gel teñido de violeta. Finalmente, los geles fueron escaneados y los pesos moleculares se estimaron usando una curva de calibración (Log_{10}PM vs R_f) a partir del marcador de peso molecular.

4.3.3. Secuenciación del genoma de la cepa I1 de *P. dicentrarchi*

Para la secuenciación del genoma del ciliado de la cepa I1 de *P. dicentrarchi*, 10^7 trofozoitos concentrados mediante centrifugación fueron congelados en nitrógeno líquido y enviados en hielo seco a la empresa Future Genomic Technologies (Leiden, Países Bajos) en la cual se combinó la secuenciación de tipo “short reading” (Illumin) y secuenciación de tipo “long reading” (Nanopore). Los datos obtenidos a partir de estos dos tipos de análisis se combinaron utilizando el programa TULIP v0.4 para el ensamblaje *de novo* de las secuencias del genoma del parásito (Jansen et al., 2017).

Gracias a este estudio se obtuvieron las secuencias completas de ADN para distintas SODs de *Philasterides dicentrarchi*.

4.3.4. Análisis bioinformático de las secuencias de las SODs

En 2018, De Felipe realizó una serie de estudios con el fin de realizar una caracterización preliminar de las SODs de *P. dicentrarchi*. A partir de los datos de un ensayo de RNA-seq de ciliados de la cepa I1 obtuvo las secuencias de nucleótidos para distintas superóxido dismutasas. Para el presente trabajo se llevó a cabo un análisis bioinformático a partir de estas secuencias de nucleótidos, las cuales permitieron conocer las secuencias de aminoácidos utilizando la herramienta informática ExPASy (<https://www.expasy.org/>). Para la realización de los análisis funcionales de las proteínas y la clasificación en familias que predicen los dominios y puntos clave, se utilizó el programa InterPro (Mitchell et al., 2019). Para la predicción de la topología de transmembrana y la ubicación de los sitios de escisión del péptido señal en las secuencias de aminoácidos, se utilizaron las siguientes herramientas: Phobius (Kall et al., 2004), SignalP (Nielsen, 2017) y Signal-3L versión 2.0 (Zhang y Sen, 2017). Para la predicción

de parámetros fisicoquímicos de la proteína se usó la herramienta ProtParam (Gasteiger et al., 2005). Los modelos de las proteínas se llevaron a cabo en el servidor DeepView (Swiss Pdb-Viewer).

También se utilizaron el programa MitoProt II-v1.10138 y las herramientas informáticas LocTree342 y PredictProtein43. El primero permite saber si la proteína presenta una secuencia de señal mitocondrial y su sitio de escisión mediante el análisis la región N-terminal de la proteína. Los otros dos programas se utilizan para la predicción de la localización subcelular. También se realizaron alineamientos de secuencias y estudios filogenéticos. Se utilizó el programa de alineamiento múltiple de secuencias Clustal Omega para alinear las secuencias de aminoácidos de Pd-Cu/ZnSOD3 y Pd-Fe-SOD. Para el análisis filogenético, los árboles de máxima verosimilitud se construyeron con un método basado en un modelo JTT con el programa Mega7 y se evaluó la confiabilidad de las ramas internas utilizando un método no paramétrico con 1,000 repeticiones. El análisis de inferencia bayesiana se realizó con el programa MrBayes 3.2.6 (Huelsenbeck et al., 2001).

4.3.5. Producción de proteínas recombinantes en levaduras

A partir de las secuencias obtenidas del RNA-seq se llevó a cabo la producción de las proteínas recombinantes en levaduras mediante el kit comercial *K. Lactis* Protein Expression kit (New England Biolabs, UK), siguiendo las instrucciones proporcionadas por el kit para la estrategia de la secreción de proteínas al medio de cultivo. En primer lugar, fue necesario diseñar el gen y los cebadores específicos que nos permitieron amplificar de forma precisa y óptima el gen que queríamos incluir al genoma de la levadura para que esta lo expresase y, posteriormente, secretase al medio de cultivo. La proteína recombinante sintetizada debe de poseer una cola de histidinas para que pueda ser purificada del medio de cultivo a través de una cromatografía de afinidad que utiliza sefarosa acoplada a níquel. Para ello, se obtuvo la secuencia de nucleótidos que codifica para la proteína de interés. Esta se modifica y optimiza para la producción de proteína recombinante en *Kluyveromyces lactis*, utilizando la herramienta bioinformática de la

compañía *Integrated DNA Technologies* (IDT; <https://eu.idtdna.com/CodonOpt>). Una vez obtenida la secuencia, se sintetiza el gen (Invitro GeneArt Gene Synthesis, ThermoFisher Scientific) y se clona en el vector pSpark® II (Canvax, España). Posteriormente, este plásmido se amplificó en bacterias *Escherichia coli* de la cepa DH-5α. Tras crecer las bacterias, extraer y purificar el plásmido, se llevó a cabo una PCR con los cebadores específicos, diseñados según las instrucciones del kit (el cebador inverso lleva una cola de histidinas en el extremo C-terminal de la proteína):

En este caso los cebadores utilizados fueron los siguientes:

CuZnSOD3 (FCSD3/RCSD3): 5'-CGCCTCGAGAAAAGAATGCATGCCATTTGTATA-3' / 5'-ATAAGAATGCGGCCGCTTAATGATGATGGTGGTG3'; FeSOD (FFSD/RFSD): 5'-CGCCTCGAGAAAAGAATGAAATCGTTGACCAAA-3' / 5'-ATAAGAATGCGGCCGCTTAATGATGGTGGTGATGGTG-3'. MnSOD (FMSD/RMSD): 5'-CGCCTCGAGAAAAGAATGAACAAG TACATAATA-3' / 5'-ATAAGAATGCGGCCGCTTAATGGTGATGGTGGTGATG-3'.

El producto de PCR se purificó y digirió, al igual que el vector pKLAC2, según las instrucciones del kit, y se ligaron. Posteriormente, las levaduras fueron transformadas con el vector clonado y se sembraron en placas de medio con agar YCB, que contenía 5 mM acetamida, a 30 °C durante 3-4 días, hasta que se formaron colonias. Transcurrido este tiempo, las colonias se inocularon en medio YPGal a 30 °C durante 3-4 días en agitación a 250 rpm. Cuando se alcanzó una densidad celular adecuada, el medio con levaduras se centrifugó a 6000 x g durante 10 min, manteniendo el sobrenadante a 4 °C hasta que se purificó. Para la purificación, se hizo pasar el sobrenadante por una cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados (IMAC), utilizando una columna de sefarosa con níquel acoplado (HisTrap™, GE Healthcare) mediante un sistema de purificación de proteínas ÄKTA Star (GE Healthcare), siguiendo las instrucciones del fabricante. Después de la elución de la proteína, esta se dializó frente a agua.

destilada usando una tripla de diálisis de un tamaño de poro de 3 kDa. Por último, la proteína se liofilizó y se almacenó a 4 °C.

4.3.6. Inmunolocalización de las SODs

4.3.6.1. Obtención de suero de ratón

Tres grupos de cinco ratones ICR (Swiss) CD-1 se inmunizaron mediante inyección i.p. con 200 µl por ratón de una mezcla 1:1 (v/v) de adyuvante completo de Freund (Sigma-Aldrich) y una solución que contenía 250 µg de proteína recombinante purificada. La misma dosis de proteína purificada se preparó en adyuvante incompleto de Freund (FIA) y se inyectó i.p. 15 días después de la primera inmunización. Los ratones fueron anestesiados y sangrados a través del plexo venoso retrobulbar antes de ser inmunizados (suero pre-inmune (control)) y transcurridos 30 días tras la primera inmunización para llevar a cabo una primera comprobación del nivel de anticuerpos. Los ratones se sangraron por completo mediante decapitación. La sangre se dejó coagular 12 horas a 4 °C y, posteriormente, se centrifugó (2000 x g durante 10 min) para obtener el suero; el cual se almacenó a -20 °C hasta su uso.

De este modo se obtuvieron los sueros anti-rCSD3 (anti proteína recombinante CuZn/SOD3), anti-rFSD (anti proteína recombinante Fe-SOD) y anti-rMSD (anti proteína recombinante Mn-SOD).

Tanto la proteína recombinante rCSD2 como el suero de ratón frente a esa proteína (anti-rCSD2) utilizados en el ensayo ELISA que se describen más adelante fueron producidos por De Felipe en 2018.

4.3.6.2. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Para la realización de TEM se siguió la técnica descrita por Paramá et al. (2006). Brevemente, los ciliados controles y tratados con SIR se concentraron por centrifugación a 1000 x g durante 5 min y se fijaron durante 12 h en glutaraldehído al 2,5 % (v/v) en tampón cacodilato sódico 0,1 M, pH 7,2 a 4 °C. Los ciliados se lavaron dos veces con tampón cacodilato 0,1 M. A continuación, se realizó una segunda fijación con OsO₄ al 1 % (p/v), en tampón cacodilato al 0,1 M durante 1 h a 4 °C y, seguidamente, se realizaron 3 lavados de 15 min con

tampón maleato-NaOH 0,05 M a pH 5,2. Posteriormente, las muestras se tiñeron con una solución de acetato de uranilo al 2 % en tampón maleato, pH 4,2; durante 2 horas a 4 °C. Tras una batería de deshidratación con acetona (5 min en cada una de las siguientes concentraciones: 25 %, 75 %, 95 %, y tres cambios en acetona al 100 %), las muestras fueron embebidas en una mezcla a partes iguales de acetona pura y resina Spurr. Secciones semi-finas fueron cortadas con un ultramicrotomo (Leica Ultracut UCT, Leica Microsystems, Alemania) y teñidas con azul de toluidina al 1% para su visualización al microscopio óptico. Una vez seleccionada la zona se realizaron los cortes ultrafinos y se pre tiñeron con una solución alcohólica de acetato de uranilo durante 10 min y, tras lavarlas exhaustivamente con etanol de 30°, se realizó una tinción con citrato de plomo durante otros 10 min seguida de dos lavados, el primero con NaOH 0,02 M y el segundo con agua bidestilada. Finalmente, los cortes ultrafinos teñidos se visualizaron en un microscopio electrónico de transmisión Jeol JEM-1011 (Jeol, Japón) a un voltaje de aceleración de 100 kV.

4.3.6.3. Ensayo de inmunofluorescencia

Para la inmunolocalización se realizó un ensayo de inmunofluorescencia como ha descrito previamente Mallo et al. (2015). Brevemente, 5×10^6 ciliados de la cepa I1 se incubaron durante diferentes tiempos con suero inmune de rodaballo, se centrifugaron a $1000 \times g$ durante 5 min, se lavaron dos veces con PBS pH 7,0 y se fijaron durante 15 min en una solución de formaldehído al 4% en PBS a temperatura ambiente. A continuación, los ciliados se lavaron dos veces con PBS y se resuspendieron en una solución que contenía Triton X-100 al 0,3% en PBS durante 3 min. Posteriormente, se lavaron dos veces con PBS y se incubaron con BSA al 1% en PBS durante 30 min. Después del bloqueo, los ciliados se lavaron en PBS y se incubaron a temperatura ambiente y en agitación a 750 rpm durante una hora con una dilución 1: 100 del suero de ratón anti-rCSD3, anti-rFSD o anti-rMSD en PBS, en cada caso. Después de 3 lavados con PBS se añadió el anticuerpo secundario cabra anti-ratón acoplado a isotiocianato de fluoresceína (FITC) (DAKO, Dinamarca) a una dilución 1:800 en PBS y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente, en agitación a

750 rpm y en oscuridad. Finalmente, tras otros tres lavados en PBS, las muestras se montaron con PBS-glicerol (1:1) y se visualizaron mediante microscopía confocal (Leica TCS SP2, Leica Microsystems, Alemania). Para este ensayo se realizaron en paralelo controles de ciliado incubados con suero pre-inmune de ratón y sin anticuerpo primario.

4.3.6.4. SDS-PAGE y Western Blot

La separación de las proteínas se llevó a cabo en geles SDS-PAGE. Para ello, las muestras se cargaron (20 µg de proteína en tampón de carga: 5M tris HCl pH 6,8; 10% SDS; 30% glicerol y trazas de azul de bromofenol) en los pocillos de un minigel de poliacrilamida lineal al 12,5% (30% acrilamida/bis 37,5:1; 1.5 M Tris-HCl pH 8.8; 10% SDS; 10% APS; 0,04% TEMED y agua destilada). En el primer pocillo se añadió un marcador de peso molecular (NZY Colour Protein Marker II, Nzytech, Portugal). Se hizo migrar el gel en tampón de recorrido (25 mM Tris; 192 mM glicina y 0.1% SDS) en una cubeta vertical Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell (BioRad) a un amperaje constante de 0,05 A y un voltaje de 150 V durante 105-120 minutos.

Una vez finalizada la electroforesis, el gel se transfirió a una membrana de PVDF para la realización del Western Blot. Para ello, la membrana se humedeció con metanol durante un 1 minuto, se lavó durante 10 minutos con agua destilada y se equilibró con tampón de transferencia (48 mM Tris; 39 mM glicina; metanol al 20% y SDS al 0,0375%; pH 9,2) durante 20 minutos en agitación. A continuación, se realizó la electrotransferencia de las proteínas del gel a la membrana en el equipo Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell, Biorad) a un voltaje de 15 V (0,5 A) durante 30 minutos.

Posteriormente, la membrana se lavó en tampón de bloqueo (5% de leche descremada en polvo en tampón TBS-T 0,2%) durante 2 h en agitación para bloquear los sitios reactivos remanentes. Trascorrido este tiempo, se retiró el tampón de bloqueo, se añadió el suero de ratón correspondiente (anti-rCSD3, anti-rFSD o anti-rMSD) a una dilución 1:100 en TBS-T 0,2% y se incubó durante toda la noche a 4 °C en

agitación. Al día siguiente, se lavó 3 veces, 5 minutos cada una, con TBS-T 0,05% en agitación, y se añadió el anticuerpo secundario de conejo anti Ig G de ratón conjugado con peroxidasa (Dakopatts, EEUU) en una dilución 1:1000 en TBS-T 0,2% y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación. Por último, la membrana se lavó 2 veces durante 5 minutos con TBS-T 0,05% en agitación, y 3 veces durante 5 minutos con TBS en agitación. Finalmente, las bandas se revelaron mediante DAB (Sigma-Aldrich).

Para este ensayo se utilizaron como muestras tanto las proteínas recombinantes de las SODs como el liofilizado obtenido del pico 2 de la cromatografía de intercambio iónico.

Los pesos moleculares se estimaron usando una curva de calibración ($\log_{10} PM$ vs R_f) a partir del marcador de peso molecular.

4.3.7. Ensayos con ciliados expuestos a radiación ultravioleta (UV)

5×10^5 ciliados/ml se cultivaron en placas de cultivo de 12 pocillos (Corning, EE.UU.) en un volumen final de 2 ml de medio completo L-15. Las placas se dejaron en el interior de un reticulador UV (UVC500, Hoefer, EE.UU.) hasta alcanzar energías de 1, 2 y 3 Julios / cm^2 (J/cm^2). A continuación, se observó la morfología y motilidad de los ciliados al microscopio invertido para confirmar la viabilidad tras la exposición. Por último, los ciliados se concentraron por centrifugación a $700 \times g$ durante 5 min. Tanto estas muestras como el medio de cultivo del ensayo se congelaron a -20°C hasta su uso.

4.3.7.1. Análisis de la expresión a nivel de proteína

4.3.7.1.1. Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)

Para la detección y cuantificación de las diferentes proteínas nativas CSD2 (Cu/ZnSOD2), CSD3 (Cu/ZnSOD3), FSD (Fe-SOD) y MSD (Mn-SOD), tanto en el medio de cultivo como en ciliados expuestos a $3 \text{ J}/\text{cm}^2$, se llevó a cabo un ELISA. Los pocillos de las microplacas de ELISA (high binding, Greiner Bio-One, Germany) se tapizaron con $1 \mu\text{g}$ de proteína en $100 \mu\text{l}$ de tampón carbonato-

bicarbonato pH 9,6 (por pocillo). Tras 12 horas de incubación a 4 °C, los pocillos se lavaron tres veces con tampón TBS (Tris 50 mM, NaCl 0,15 M, pH 7,4) que contenía un 0,05% de Tween 20 (TBS-T 0,05%). Posteriormente, los pocillos se bloquearon con leche desnatada en polvo al 5% en tampón TBS con un 0,2% de Tween 20 (TBST-T 0,2%) durante 1 h. Transcurrido este tiempo los pocillos se volvieron a lavar 3 veces y, a continuación, se incubaron durante 30 min a 37 °C en un agitador de microplacas a 750 rpm con el anticuerpo primario de ratón correspondiente a una dilución 1:400 en TBS-T 0,2%. A continuación, los pocillos se lavaron 3 veces con TBS-T 0,05% y se incubaron con anticuerpo secundario cabra anti Ig G de ratón conjugado con peroxidasa (DAKO, Dinamarca), dilución 1:2000 en TBST-T 0,2%, durante 1 hora en agitación y en oscuridad. Finalmente, se lavaron 5 veces con TBS-Tween 0,05% y se llevó a cabo el revelado de la peroxidasa con OPD (ortofenildiamina, Sigma-Aldrich) añadiendo 100 µl por pocillo y dejando reaccionar durante 20 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Transcurrido este tiempo, se paró la reacción añadiendo 25 µL de H₂SO₄ (3M) y se midió la densidad óptica a 492 nm en un lector de placas ELISA (Labsystem Multiscan RC, LabSystems S. A. C., Finlandia).

En este caso, los pocillos de las microplacas de ELISA (high binding, Greiner Bio-One, Germany) se tapizaron con 1µg del liofilizado del pico 2 de la cromatografía de intercambio iónico obtenido a partir de ciliados expuestos y no expuestos a radiación UV, con proteína recombinante purificada (rCSD2, rCSD3, rFSD y rMSD) o con medio de cultivo (medio incompleto L-15) de ciliados expuestos o no expuestos a radiación UV (en este último caso el tampón de acoplamiento se utilizó 10 veces concentrado de tal modo que al diluirlo con el medio incompleto L-15 quedase finalmente a una concentración 1X). Como anticuerpo primario se utilizaron los sueros de ratón anti-rCSD2, anti-rCSD3, anti-rFSD y anti-rMSD; en cada caso. Como control se utilizó suero de ratón pre-inmune.

4.3.7.1.2. Western Blot

Para analizar la expresión de la proteína CSD3 se llevó a cabo un Western Blot, como se describe anteriormente, utilizando suero de ratón anti-rCSD3 (a una dilución 1:100) frente a proteínas presentes en el pico 2 obtenido de la cromatografía de intercambio iónico a partir de ciliados no expuestos o expuestos a diferente radiación UV (1, 2 o 3 J/cm²). Las membranas se escanearon y se analizó la intensidad de las bandas utilizando el software *Image J* (<https://imagej.nih.gov/ij/>).

4.3.7.2. Análisis de la expresión de genes mediante RT-qPCR

Para determinar cómo afecta la radiación UV a la expresión del gen que codifica para la proteína CSD2 se llevó a cabo una qPCR utilizando como muestra ADNc de ciliados sin tratar o expuestos a diferente radiación UV (1,2 o 3 J/cm²). Para ello, en primer lugar, se purificó el ARN total de los trofozoítos con el kit RNA NucleoSpin (Macherey-Nagel) siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación, se llevó a cabo el tratamiento de las muestras con DNasa (DNase I, RNase-free; Thermo Scientific) para eliminar por completo los posibles restos de ADN remanentes tras la extracción de ARN. La calidad, la pureza y la concentración del ARN se midieron en un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, EE.UU.).

La síntesis de ADNc (25 µL/reacción), se llevó a cabo con 1,25 µM de cebadores aleatorios (*Random primers*, Promega. EEUU.) y 250 µM de cada deoxirribonucleótido trifosfato (dNTP). Esta mezcla, junto con la muestra (a una concentración de 2 µg) se incubó en un termociclador a 37 °C durante 5 minutos. Posteriormente, se incorporaron los demás reactivos: 10 nM DTT; 20 U de inhibidor de RNasas; 2,5 mM de MgCl₂ y 200 U de reversotranscriptasa MMLV (*Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase*, Promega. EEUU) en 30 nM de Tris y 20 mM de KCl (pH 8,3). Esta mezcla se incubó durante 10 minutos a 25 °C, posteriormente 50 minutos a 37 °C y, finalmente 15 minutos a 70 °C. La concentración final de ADNc se llevó a cabo en un NanoDrop 2000/c y las muestras las muestras se almacenaron a -80 °C.

Para la qPCR se mezclaron 5 µl Kapa SYBR FAST qPCR Master Mix (2X) (Sigma-Aldrich), 300 nM de la pareja de cebadores, 1 µl de ADNc (< 20 ng) y agua libre de RNasa y DNasa; volumen final de 10 µl. La qPCR se desarrolló a 95 °C durante 5 min, seguido de 40 ciclos a 95 °C durante 10 s y 60 °C durante 30 s, terminando con 95 °C durante 15 s, 55 °C durante 15 s y 95 °C durante 15 s. La qPCR fue realizada en un sistema Eco RT-PCR (Illumina) y la cuantificación relativa de la expresión génica se determinó por el método de $2^{-\Delta\Delta C_q}$ (Livak y Schmittgen, 2001) empleando el programa de conformidad MIQE (guías de mínima información para publicación de experimentos de PCR cuantitativa en tiempo real) (Bustin et al., 2009).

Para el diseño de los cebadores se usó el programa Primer 3Plus, con parámetros por defecto, para diseñar y optimizar los conjuntos de cebadores.

Los cebadores utilizados en este ensayo fueron: CSD2 (FqCSD2/RqCSD2) 5'-CCCAGGCATTGAAGAGAAAC / GCACCTGCATTTCCTGTTTT-3'. Como gen de referencia se utilizó el gen del factor de elongación 1-alfa (número de acceso en GenBank: KF952262): EF-1α (FEF1A / REF1A) 5 'TCGCTCCTTCTTGCATCGTT-3' / 5 'TCTGGCTGGGTCGTTTTTGT-3'.

4.3.7.3. Análisis de la actividad enzimática mediante el ensayo fenosulfonato (PMS) – nitroazul de tetrazolio (NBT)

La actividad de SOD se midió espectrofotométricamente utilizando el ensayo PMS-NBT (Nishikimi et al., 1972). En este ensayo se produce la reducción de NBT por los radicales superóxido generados por una mezcla de nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) y PMS a pH no ácido. Como muestra se utilizó el liofilizado del pico 2 obtenido de la cromatografía de intercambio iónico a partir de ciliados sin tratar o tratados con 3 J/cm² de radiación UV. Se dispusieron 100 µl (concentración 1 mg/ml) de la muestra correspondiente en microplacas de 96 pocillos (Corning, EE. UU.), por triplicado. A continuación, se añadió a cada pocillo una mezcla que contenía NBT 50 µM y NADH 78 µM en tampón de fosfato sódico (PB) 100 mM a pH 7.4 La reacción

se inició mediante la adición de 100 μ L de PMS (PMS 5 M en PB 100 mM pH 7.4). Las placas se incubaron a 25 °C durante 60 min. El formazán resultante de la reducción de NBT por los radicales superóxido generados por la autooxidación de PMS se midió espectrofotométricamente a 560 nm. A medida que se produce la activación enzimática, se observa una reducción en el color azul generado. Los resultados de la actividad enzimática se cuantificaron como la disminución de la absorbancia a 560 nm/min.

4.4. RESULTADOS

4.4.1. Purificación de la fracción citoplasmática que contiene las SODs y evaluación de su actividad enzimática

Para el aislamiento de las SODs, se realizó una lisis de los ciliados y una separación mediante cromatografía de intercambio aniónico que permitió obtener la fracción que contiene actividad enzimática SOD. La Figura 1A muestra el perfil cromatográfico, en el que se observan 3 picos de absorción máxima a 280 nm. El análisis de la actividad enzimática SOD de las tres fracciones en gel PAGE no desnaturizante muestra que la actividad enzimática ocurre en el segundo pico de elución, detectándose tres bandas con pesos moleculares relativos de 39, 50 y 60 kDa, respectivamente (Figura 1B).

La adición de inhibidores de la actividad de la SOD, como el cianuro sódico, el peróxido de hidrógeno, la azida sódica o el polifenol resveratrol (RESV) a una concentración de 100 μ M produce la inhibición de la actividad de la SOD (Figura 1C). Específicamente, el NaCN causa la inhibición total de la banda de 39 kDa, el H₂O₂ produce una inhibición total de la banda de 60 kDa y una inhibición parcial de la banda de 39 kDa; mientras que tanto NaN₃ como RESV producen una inhibición completa de la actividad enzimática de la banda de 60 kDa (Figura 1C).

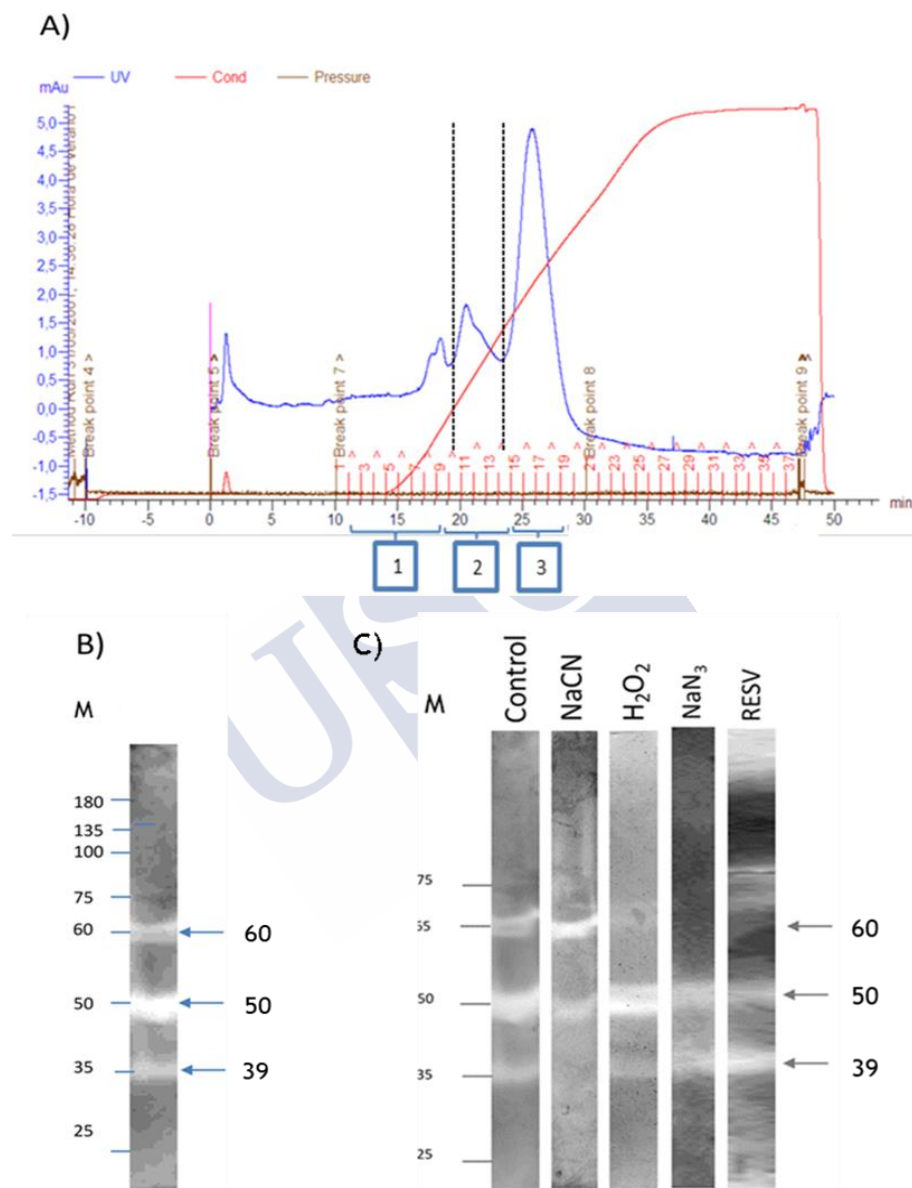


Fig. 1: A) Perfil de elución de un extracto soluble de *P. dicentrarchi* separado a través de una columna HiTrap Q de intercambio iónico utilizando un equipo ÄKTAprius plus (GE Healthcare). Después de la cromatografía, las fracciones correspondientes a los tres principales picos obtenidos de la separación de la muestra

(1-3) se recogieron y se sometieron a un análisis de la actividad enzimática. B) Gel de poliacrilamida (PAGE) para analizar la actividad SOD con una tinción de NBT. Se observó que la actividad enzimática SOD (flechas; 39, 50 y 60 kDa) se encuentra en el pico 2. M: marcador de peso molecular en kDa. C) Gel de poliacrilamida (PAGE) para analizar la actividad SOD con una tinción de NBT en el pico 2 a partir de cilios incubados previamente con cianuro sódico (NaCN), peróxido de hidrógeno (H₂O₂), azida sódica (NaN₃) y resveratrol (RESV), o sin inhibidores (control). Las flechas indican las bandas de actividad SOD que se observan por la aparición de bandas de decoloración en el gel. Las posiciones y los tamaños de peso molecular en kDa se indican a la izquierda de la imagen (flechas). M: marcador de peso molecular en kDa.

4.4.2. Caracterización molecular de las enzimas SODs de *P. dicentrarchi*

A partir del análisis del genoma se encontraron las secuencias completas de ADN para la Cu/ZnSOD1, Cu/ZnSOD2, MnSOD y FeSOD (no se encontró la de la Cu/ZnSOD3) (Figura 2).

A)

```

      10      20      30      40      50      60
ATGGTAGAAG CCAAAGTCAC TTATGCTATT TGCATATTAA GGAAGATGG AGGATCTGGA

      70      80      90     100     110     120
GTCAACGGAC TTGTTAAATT AAGACAAGAA GAAGGACAAT AAGTTGAATT AAAAGCTGAA

     130     140     150     160     170     180
ATCAAAGGTT TGCTGCTGG ATTACACGGA TTCCACATTC ACCAATTGG AAATTTAACT

     190     200     210     220     230     240
GAAGGATGCA AAAGTCTGG ACCTCACTAC AACCCGAAG GAGTCGTAAA AATTTAACCA

     250     260     270     280     290     300
TTAATTTTAA AAACCATAAA CACAAGAATA TAAATATCTA ATTGTTTACC TTAATTTTAT

     310     320     330     340     350     360
ATGTTTATAT TTAATAATTA ATTATATTTT ATTAATAAAT AAATTTTTTT CTTTTATTTA

     370     380     390     400     410     420
AAAGGTTTAC GGAGGACCTG AAACCTAAGT AAGACACGTA GGAGACTTAG GAAACATCCT

     430     440     450     460     470     480
GTAAATTAAT AACTTAATAT TAAATTATAC AATTATTTTA TATTTTTTAA TTGCTTAAGT

     490     500     510     520     530     540
AGCAAATATA CAAATTTCTG AAAATTATAA TGAATTTTTT ATAAATAGTT CTCAAGGAAA

     550     560     570     580     590     600
CGGACAAGAC GTTCATGTTA TGAAAGACAG ATTAGTTAAT ATTTAGATG TATTAGGAAG

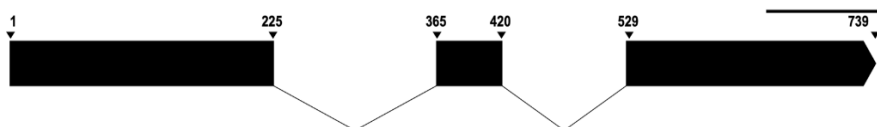
     610     620     630     640     650     660
ATCTTTCGTT GTCCATGCTG GAGAAGATGA TTTAGGACAA GGAGTTGGAG ACAAAGCTGA

```

670 680 690 700 710 720
TGAATCTAAA AAAACTGGAA ATGCTGGAGC TAGATTAGCT TGTGGAGTCA TCGGAATCTC

730
TGGACCTTTC GATTGGTGA

Secuencia de ADN (Cu/ZnSDO1)



B)

10 20 30 40 50 60
ATGTTAAAAA CTTTAGCTTG TGGATTGGA GGTGCATTCA TTTATAATAA TTTATCTTCC

70 80 90 100 110 120
TAAAAAACA CTAATACTCC TATTTAAAAT ATTTAAAAAT CAACTTAAAG AAATGCTATT

130 140 150 160 170 180
TGCATTCTCT ATCCCGATAA TAACTCAGGA GTTAAAGGAA TAGTATCATT CTAATAAGAT

190 200 210 220 230 240
AAATTAGCG ACCCTTGCAA AATCGTAGTT AATGTAAAAG GACTTAAACC TAATTCTAGT

250 260 270 280 290 300
CATGGATTCC ACATTCATGA ATTTGGTATA AAATTATAAA TTTTATTATT TTAAATAAAC

310 320 330 340 350 360
TATATATTTT AGTAACACAA ACAATAATTT CAAATTTAGC AATAATTATA TTTCATATAC

370 380 390 400 410 420
ATCATTTAAT AAATATATTT ATATAATTTA ATATTATAGG AGACTTGACT GAAGGATGCA

430 440 450 460 470 480
CAACTGCTGG ACCCCACTAC AACCTGAAG GAAAAAATCA TGGAGGTCCT TTAGACCAAG

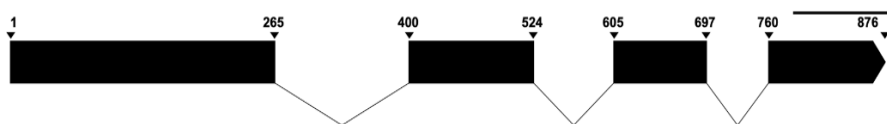
490 500 510 520 530 540
AAAGACACGT AGGTGACTTA GGAAACTGA AAACTGATGA AAAGGTAAAA TATATATAGC

550 560 570 580 590 600
ATAGTATTGC AATTAACA AAGCAAATAA AGATAAAATAAAAA TAAAAATTAT

610 620 630 640 650 660
TAAGGGAAAT GCTTATCAAG CTAATAAAGA TAAATTAGTT ACTTTGTATG GAGAATTTAG

670 680 690 700 710 720
 TGTATTAGGA AGAAGTTGCG TTGTCATTA AAACAAAGTA TTATATATTG ATAATAAATC
 730 740 750 760 770 780
 GATTATTGCT TGCATTATTT ATTTTAATTA CAATTAAAGG ATGATGAAGG AAAAGGAGGT
 790 800 810 820 830 840
 CATGAATTAA GTTTAACCAC AGGAAACAGT GGACCTAGAG TTGCTTGTGG AGTAATTGGA
 850 860 870
 ATTGCAGCCG AATTTAAAAA TATCACTCCT AAATGA

Secuencia de ADN (Cu/ZnSDO2)



c)

10 20 30 40 50 60
 ATGAAATCTC TTAATAAATT AATTAGATAT AGATTTTCTT CTTATACTCC TGCCACTTTA
 70 80 90 100 110 120
 CCTAAGTTGG ATTTTGAATA TGGAGAATTA GAACCCGTTT TATCAGCTAA TTTATTATCT
 130 140 150 160 170 180
 TTCCACCACG GAAAAACACCA TTAAACTTAT GTCAACAACCT TAAATGCAAT TTACAAATAA
 190 200 210 220 230 240
 ATAGAAGACG CTACCGCCTA AGGAGATGCT AAAAAAGTTG CTTCAATTACA ACCCGCTTTA
 250 260 270 280 290 300
 AGATTCAATT TAGGAGGTCA CTTGAACCAC TCTATTTACT GGAAAAACTT AGCCCCCTAAA
 310 320 330 340 350 360
 GGAAAAGGAG GAGGTGTTTT ACCTTAAGCT TCTTCTCCTC TTTCTTAAGC TATTCAATAA
 370 380 390 400 410 420
 TAATATGGAG GATATGAAAG TTTTATGCAA GAATTCAACA AAAGAGCTGC CGCCATTTAA
 430 440 450 460 470 480
 GTAAATCGCA TATATACATG ATAATTACTT AATTCAAATG TATTTTATAA TTAATAATTT
 490 500 510 520 530 540
 AAATATTAAT AAAATAAAAA TAATTTTCAA GGGAAGTGGA TGGGGATGGT TAGCCTATGA
 550 560 570 580 590 600
 CACTGTCAAT AAAAAATTGA GATTATTGTA ATTAGCTAAT TAAGAAATCC CTGATTTTTC

610 620 630 640 650 660
 TGATTGCATC CCTTTATTAA GTACATATAA ATTTATTTT ATAAAAATA GTATCTTTTA
 670 680 690 700 710 720
 TAATATACAA TTTAGCTATT GATATGTGGG AACATGCTTT CTATCTTGAT TACTAAAACG
 730 740 750 760 770 780
 TTAAAGTTAA ATATTTAAGC GATATCTGGT AAATTGTCAA CTGGGCTGAC GTTGAAGCAA
 790 800
 GATATCTTGA TGCTATTAAA TAAAATTGA

Secuencia de ADN (MnSOD)



D)

10 20 30 40 50 60
 ATGAATAAAT ATATTATCTT CTTCTTCTT GCAGTAATTG CTTCTGTGAA CTCATCATCA
 70 80 90 100 110 120
 GGTGATGACG AATGCAACCA CGCAATTGGA GGGTAGTTTC CTTATACTGC TTTAGAATAT
 130 140 150 160 170 180
 CCTTATAATG CTCTAGAGCC CTTCAATTATA TAATAAACCA TGGAATTACA TCATGATAAA
 190 200 210 220 230 240
 CATTACAAAG TAAATATTTA ATAATATATA AAAATAAATT CATTATATAA CAAATTATAT
 250 260 270 280 290 300
 TTTATTTTAA TGCAGGCCTA TACTGATAAT TGTAATGCGG CTGTTATTAA TACTCCGCTT
 310 320 330 340 350 360
 GTAACCTTAT CAATGGAAGA CATAATCAGG GATTATTCGA GATAAAATAC TAAAATTAGA
 370 380 390 400 410 420
 AACAACTGTG GAGGGTATTA CAACCACTGC TTGTTTTGGA AATTCATGCA AGTAATATAG
 430 440 450 460 470 480
 GAATCTCTTT AAATGAATAA AGAAATTATA AAAATAAAGA AATTTTAAAT AAACATTTTG
 490 500 510 520 530 540
 TTAAATTTA TTAATAAAG GGAAATTAAA ACCAATTACC TGAAGGTAAG CTCATGAAAC
 550 560 570 580 590 600
 ATATATAAAA ATCTTTTGGA AATTATGATA GTTTTGTTGA ATAATTTGAA ACTGCCGCTT

610 TTTGAGTTT TGGATCAGGA TGGGCATGGC TGGTATTGAC AGAAAATTAG GGTGAAGGTA
 620
 630
 640
 650
 660
 670 AAATGATTGT TTATAATTGA ATATTTATTT TATGATATTA AATGGGATT CTTTAGATT
 680
 690
 700
 710
 720
 730 AAAACTTAAG AATATGCTCC ACTCCAAATT AAGATTCTCC TTTGTTCAT TAAACGACT
 740
 750
 760
 770
 780
 790 AACAAATGTA AGGATAAATT ATCCTTCTTT TGGACGTTTG GGAACATGCT TATTATCTTC
 800
 810
 820
 830
 840
 850 AATACTTTAA TGTTAGAGCC AACTATATAA ATAATTGGTG GAGTGTAGTA AATTGGAGAT
 860
 870
 880
 890
 900
 910 ATGCTGAAAG AAGATATGAA AAAGCTATGG AATATTCAAA AACCAAAAAA ATAGATTAC
 920
 930
 940
 950
 960
 TTTGA

Secuencia de ADN (FeSOD)



Fig. 2: Secuencias de ADN para los genes A) Cu/ZnSOD1, B) Cu/ZnSOD2, C) MnSOD y D) FeSOD. Debajo de cada secuencia se representa de manera esquemática la presencia de exones (negro) e intrones (blanco) a escala. La barra indica una escala de 100 nucleótidos.

Estas secuencias presentan intrones al compararlas con las secuencias del transcriptoma obtenidas mediante el estudio del RNA-seq, gracias al cual se encontró que *P. dicentrachi* expresa genes que codifican proteínas para tres Cu/ZnSOD, una MnSOD y una FeSOD. A través del programa DeepView (Swiss Pbd-Viewer) se llevó a cabo la predicción de la estructura de las proteínas, siendo todas ellas diméricas (Figura 3 y Figura 4).

Con respecto a los parámetros bioquímicos, la forma Pd-Cu/ZnSOD1 tiene un ORF de 492 pares de bases (pb) (número de acceso en GenBank: MH427342), que codifica una proteína (CSD1) de

163 aminoácidos (aa), con un peso molecular estimado (PM) de 17173.30 daltons y un punto isoelectrico estimado (pI) de 5.70 (Figura 3A); la forma Pd-Cu/ZnSOD2 presenta un ORF de 600 pb (número de acceso en GenBank: MK348945) que codifica una proteína (CSD2) de 199 aa, con un PM estimado de 21385.98 daltons y un pI estimado de 8.18 (Figura 3B) ; la forma Pd-Cu/ZnSOD3 posee un ORF de 591 pb (número de acceso en GenBank: MK348946) que codifica una proteína (CSD3) de 196 aa, con un PM estimado de 22197.45 daltons y un pI estimado de 9.37 (Figura 3C). Los alineamientos de las secuencias de aa de las 3 proteínas relacionadas con las Pd-Cu/ZnSOD presentan regiones con dominios conservados (Figura 3D); sin embargo, la identidad global entre los aa de sus secuencias es baja, variando entre el 43% y el 51% (Figura 3E). Las anotaciones ontológicas genéticas de estas secuencias indican que su función molecular está relacionada con la unión de iones metálicos, procesos biológicos de oxidación-reducción y procesos metabólicos. CSD1 presenta sitios de unión a Cu^{2+} en las histidinas (H) 52, 54, 69 y 123; sitios de unión a Zn^{2+} en las H 69, 77, 86 y en el ácido aspártico (D) 89; sitios activos en las H 52, 54, 69, 86, 123 y en el D 89; interfaz de dímero de clase E en las isoleucinas (I) 10 y 12, las leucinas (L) 24 y 116, la lisina (K) 26, en la fenilalanina (F) 56, en las glicinas (G) 57 y 114, y en la asparagina (N) 58; e interfaz de dímero de clase P en el ácido glutámico (E) 36 y en la L 94 (Figura 3A). CSD2 presenta sitios de unión a Cu^{2+} en las H 86, 101 y 158; sitios de unión a Zn^{2+} en las H 101, 109, 118 y en D 121; sitios activos en las H 84, 86, 101, 118, 158 y en el D 12; interfaz de dímero de clase E en las I 40, 42, 54, en la serina (S) 56, en la F 88, en las G 89 y 152, y en la L 151; e interfaz de dímero de clase P en las L 67 y 126. Según el programa Signal-3L 2.0, CSD2 tiene un péptido señal entre los aa 1 y 40; sin embargo, según el programa de predicción de péptidos señal y topología de transmembrana Phobius, el péptido señal se encuentra entre los aa 1 y 20, presentando una región N entre los aa 1 y 3, una región H entre los aa 4 y 15 y una región C entre los aa 16 y 20 (existiendo una región no citosólica entre los aa 21 y 199) (Figura 3B). CSD3 posee sitios de unión a Cu^{2+} en las H 44, 46, 61 y 118; sitios de unión a Zn^{2+} en las H 61, 69, 78 y en el D 81; sitios activos en las H 44, 46, 61, 78, 118 y en el D 81; interfaz de dímero de clase E en las G 49

y 112; e interfaz de dímero de clase P en la E 86. Presenta una región citoplasmática entre los aa 1 y 157, una región de transmembrana entre los aa 158 y 176, y una región no citoplasmática entre los aa 177 y 196; según el programa Phobius (Figura 3C).

A partir del análisis realizado con la herramienta informática Blastx, utilizando la base de datos de *Tetrahymena termophila*, se ha visto que *P. dicentrarchi* tiene una SOD dependiente de Mn y una SOD dependiente de Fe (Figura 4). El gen Pd-MnSOD (número de acceso en GenBank: MK348948.1) de 663 pb codifica para una proteína (MSD) de 220 aa con un PM de aproximadamente 25074.43 daltons y un pI estimado de 7.06. Esta proteína contiene una señal de exportación a las mitocondrias entre los aa 1 y 12; un sitio de escisión en la S 13; y 4 sitios de unión a Mn en las H 42, 43, 46 y 47.

El programa Phobius predice que esta proteína presenta un péptido señal entre los aa 1 y 21, una región N entre los aa 1 y 4, una región H entre los aa 5 y 16 y una región C entre los aa 17 y 21 (Figura 4A).

El gen Pd-FeSOD (número de acceso en GenBank: MK348949.1) de 750 pb codifica para una proteína (FSD) de 249 aa con un PM estimado de 29154.81 daltons y un pI teórico de 5.79. Presenta 6 sitios de unión a Fe en las cisteínas (C) 25 y 69, y en las H 27, 57, 58 y 61 (Figura 4B). El modelo de predicción del estado oligomérico de las proteínas reveló que tanto MSD como FSD son homodiméricas.

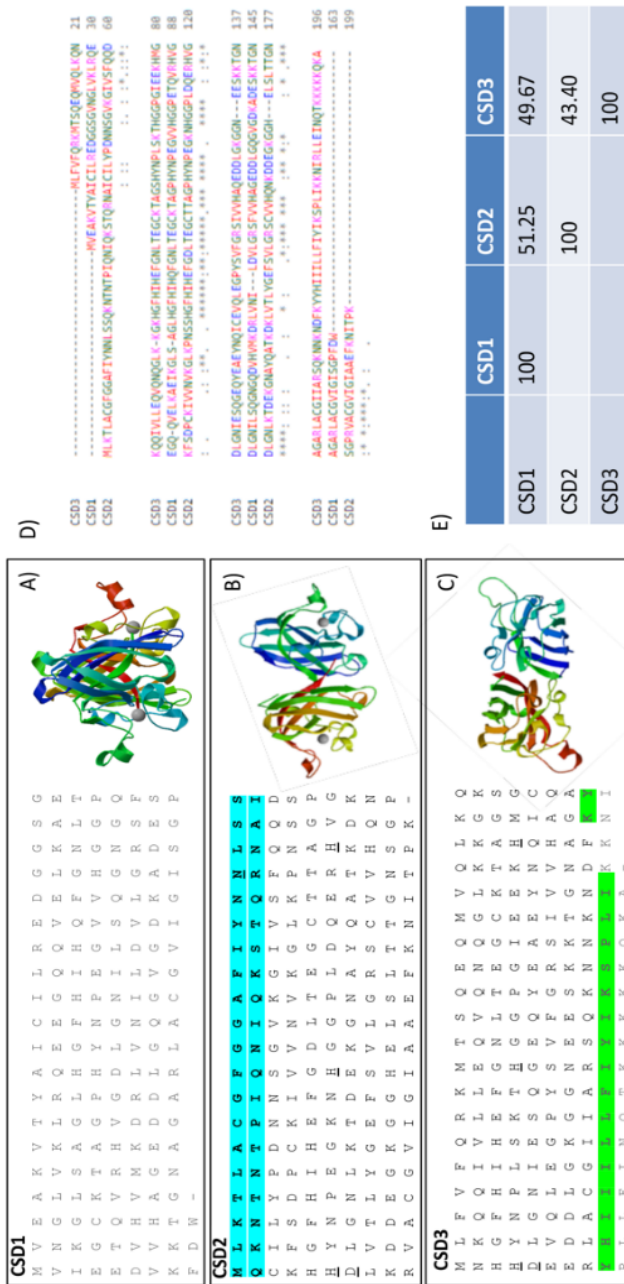


Fig. 3: A-C) Secuencias de aminoácidos de tres proteínas identificadas como Cu/ZnSOD (CSD1-3) obtenidas a partir de un análisis de RNA-seq de la cepa I1 de *P. dicentrarchi* y modelo molecular de las proteínas utilizando el programa DeepView (Swiss Pdb-Viewer). La región sombreada en azul en la secuencia indica la existencia de un péptido señal y la región sombreada en verde indica la presencia de una región transmembrana. D) Alineamientos de las secuencias de las tres proteínas encontradas en la cepa I1 de *P. dicentrarchi* realizados con los programas Clustal Omega. Los símbolos en la parte inferior indican los niveles de conservación de las secuencias: (*) totalmente conservadas; (.) altamente conservado; (.) sustitución conservada. E) Matriz de identidad porcentual realizada con el programa Clustal2.1.

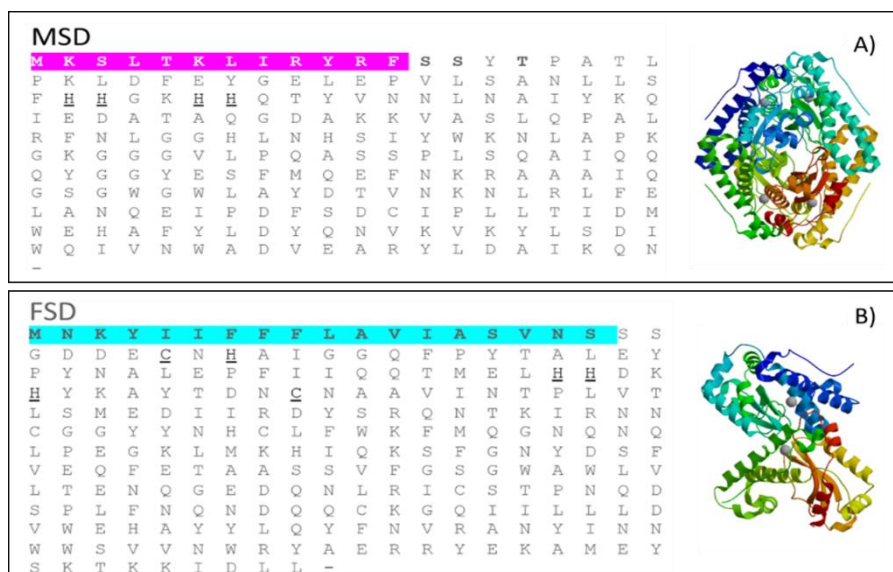
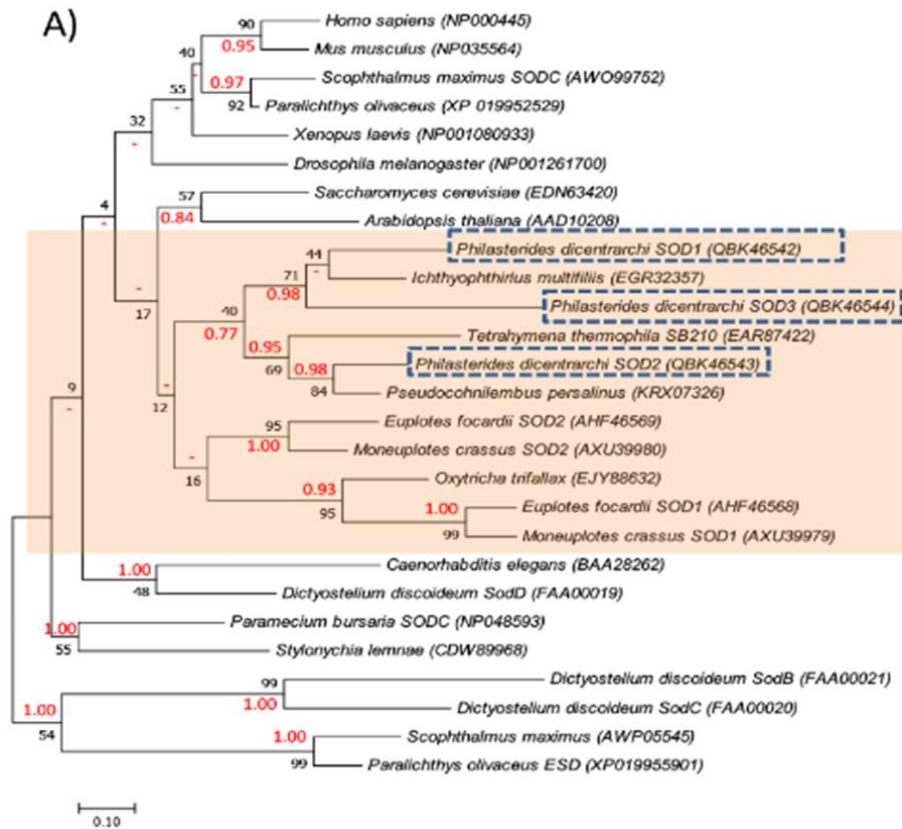


Fig. 4: Secuencias de aminoácidos de dos proteínas identificadas como Mn-SOD (MSD) (A) y como Fe-SOD (FSD) (B) obtenidas a partir de un análisis de RNA-seq de la cepa I1 de *P. dicentrarchi* y modelo molecular de las proteínas utilizando el programa DeepView (Swiss Pdb-Viewer). La región sombreada en rosa en la secuencia de la proteína MSD indica la existencia de un péptido de exportación a las mitocondrias y la región sombreada en azul en la secuencia de la proteína FSD indica la existencia de un péptido señal.

La evolución molecular de las enzimas Pd-Cu/Zn-SOD y Pd-Mn/Fe-SOD se estudió en el marco de secuencias de las SODs conocidas tanto en especies de ciliados como en otras especies que pertenecen a los grupos eucariotas más representativos (Figura 5). El árbol filogenético obtenido por métodos de máxima verosimilitud e inferencia bayesiana indica que Cu/Zn-SOD de *P. dicentrarchi* está estrechamente relacionada con Cu/Zn-SOD de otros ciliados y más separada de las SODs de otras especies de eucariotas. Concretamente, Pd-Cu/Zn-SOD1 y Pd-Cu/Zn-SOD3 están estrechamente relacionadas con Cu/Zn-SOD del ciliado *Ichthyophthirius multifiliis*, mientras que el Pd-Cu/Zn-SOD2 está más relacionada con una SOD del escuticociliado *Pseudocohnilembus persalinus* (Figura 5A). Con respecto a las isoenzimas Pd-Mn/Fe-SOD, el análisis filogenético confirma que ambas enzimas están relacionadas con las SODs de tipo Mn-SOD y Fe-

SOD de eucariotas (Figura 5B). Por otro lado, el árbol filogenético muestra que Pd-Mn-SOD se agrupa con Fe/Mn-SOD de otros ciliados y está estrechamente relacionado con una Fe/Mn-SOD del escuticociliado *P. persalinus*, mientras que la Pd-Fe-SOD está agrupada con la Fe/Mn-SOD de *Paramecium* y una Fe-SOD de la planta *Arabidopsis* (Figura 5B).



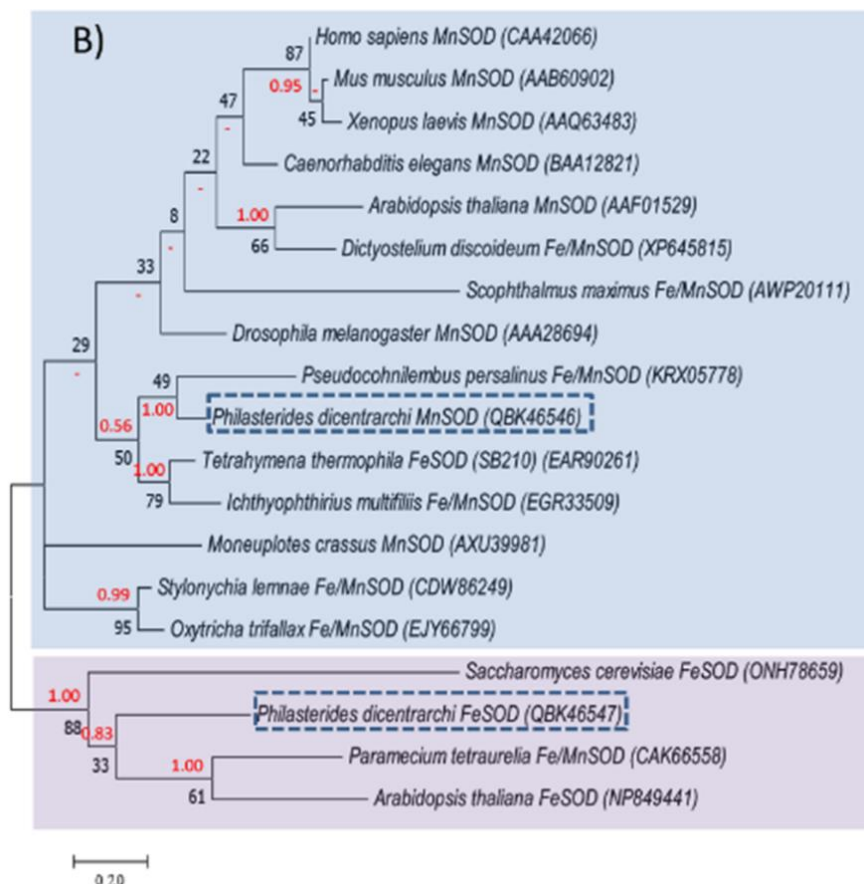


Fig. 5: Análisis filogenético de las proteínas A) Cu/Zn-SOD y B) Mn-SOD (azul) y Fe-SOD (morado) de *P. dicentrarchi* mediante los métodos de máxima verosimilitud y de inferencia bayesiana, respectivamente. Se muestran los árboles con la probabilidad de registro más alta (A) (-4402.19) y (B) (-1780.26). El análisis evolutivo se realizó con los programas MEGA7 y MrBayes 3.2.6. Los árboles iniciales para la búsqueda heurística se obtuvieron automáticamente aplicando los algoritmos de Neighbor-Joining y BioNJ a una matriz de distancias por pares estimada usando el modelo JTT y seleccionando la topología con un valor de probabilidad de registro superior. El análisis incluyó (A) 27 y (B) 19 secuencias de aa. Los números en las ramas representan el valor de arranque para el análisis de máxima verosimilitud (negro) y el valor de probabilidad posterior del análisis de inferencia bayesiana (rojo). Los códigos que aparecen junto a la especie entre paréntesis son los números de acceso a la secuencia GenBank. Los guiones (-) indican desacuerdo entre los análisis. La barra de escala corresponde a 10 (A) o 20 (B) sustituciones por 100 posiciones de aa.

4.4.3. Localización celular de las SODs en *P. dicentrarchi*

Para determinar la localización de las isoenzimas Pd-SOD se utilizaron dos estrategias. Por un lado, la localización se estimó mediante el uso de herramientas bioinformáticas de predicción (PredictProtein y LocTree3). Por otro lado, se determinó la localización mediante un ensayo de inmunofluorescencia indirecta utilizando anticuerpos contra las proteínas recombinantes correspondientes a Pd-Cu/ZnSOD3 (r-CSD3), Pd-FeSOD (r-FSD) y Pd-MnSOD (r-MSD).

Según el análisis de los programas bioinformáticos de predicción, las isoenzimas CSD1 y CSD2 se ubicarían en el citoplasma, mientras que la CSD3 se ubicaría en estructuras relacionadas con los cloroplastos o en el espacio periplásmico. Para MSD la localización subcelular sería mitocondrial y para FSD citoplasmática.

Mediante ensayos de Western Blot se confirmó que las proteínas monoméricas recombinantes tienen el tamaño correspondiente a las proteínas originales de las que derivan: 20 kDa para el monómero CSD3, 25 kDa para el monómero MSD y entre 30 kDa para el monómero FSD (Figura 6A). Los anticuerpos generados contra las proteínas monoméricas recombinantes reconocieron las proteínas nativas del ciliado, presentando un tamaño correspondiente al doble del peso molecular de los monómeros (Figura 6B). Una vez confirmado que los sueros de ratón eran específicos para las formas nativas del ciliado se llevó a cabo un ensayo de inmunofluorescencia sobre trofozoítos de *P. dicentrarchi*. A partir de las microfotografías realizadas en el microscopio confocal se puede observar que el anticuerpo anti-rCSD3 marca la membrana celular asociada con los sacos alveolares (Figura 6C), el anticuerpo anti-rFSD marca de manera difusa todo el citoplasmas (Figura 6E) y el anticuerpo anti-rMSD marca las mitocondrias (Figura 6D); las cuales están dispuestas de manera alineadas justo debajo de la membrana plasmática (Figura 6F).

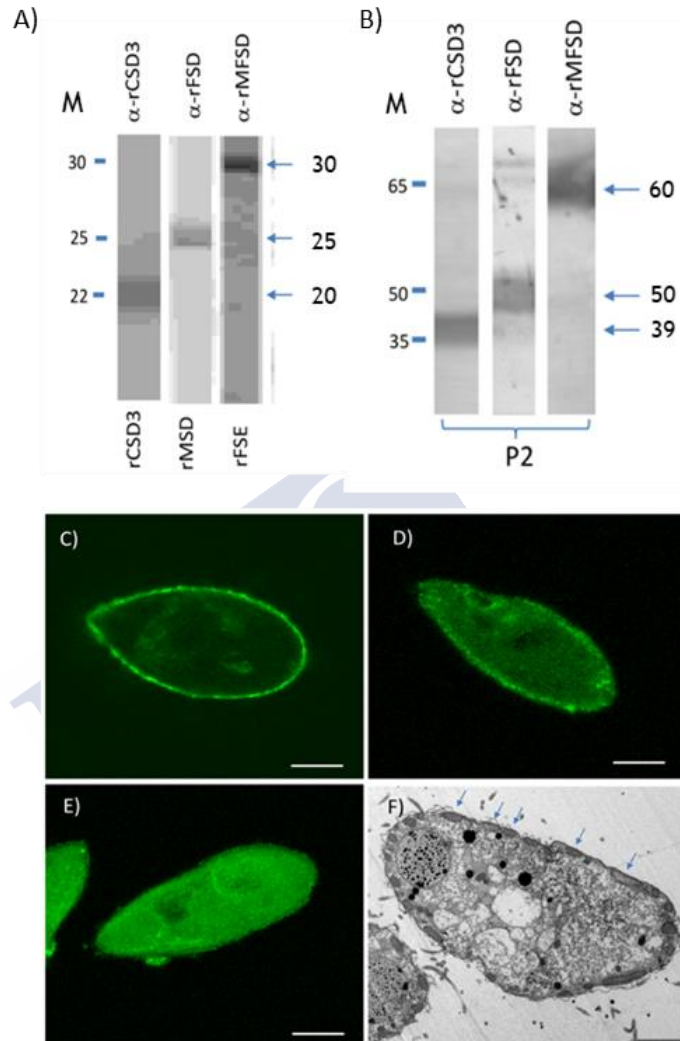


Fig. 6: Arriba: Western Blot utilizando anticuerpos policlonales frente a los monómeros de las proteínas recombinantes de la forma 3 de la isoenzima Cu/ZnSOD (rCSD3), la isoenzima FeSOD (rFSD) y la isoenzima MnSOD (rMSD) producidas en la levadura *Kluyveromyces lactis* (A), y frente a la fracción purificada mediante cromatografía de intercambio iónico con actividad SOD (pico 2, P2) (B). M: marcadores de peso molecular en kDa. Abajo: Patrones de inmunotinción mediante microscopía confocal utilizando los anticuerpos policlonales anti-rCSD3 (C), anti-rMSD (D) y anti-rFSD (E). (F) Microfotografía realizada al TEM de un trofozoito de *P.*

dicentrarchi que muestra la presencia de mitocondrias alineadas (flechas) debajo de los sacos alveolares. Tamaño de la barra: 10 μm .

4.4.4. Expresión de las SODs en trofozoitos de *P. dicentrarchi* expuestos a radiación ultravioleta (UV) y estrés oxidativo

Los resultados de los ELISA muestran que los ciliados (P2) expuestos a la luz UV expresan un nivel más alto de isoenzimas SODs que los ciliados no expuestos. Tanto los niveles de proteína de CSD3, como de MSD y FSD aumentan significativamente después de una exposición a radiación UV con una energía de $3\text{J}/\text{cm}^2$ (Figura 7A-D).

Además, a partir de los datos obtenidos al utilizar como muestra el medio de cultivo (L15) de ciliados irradiados y no irradiados, se pudo confirmar la existencia de SODs extracelulares (secretadas por el ciliado). La forma CSD2 es secretada al medio por el ciliado cuando este es irradiado (forma extracelular) (Figura 7A), al igual que la forma FSD (Figura 7D); mientras que las formas CSD3 (Figura 7B) y MSD no se secretan (Figura 7C).

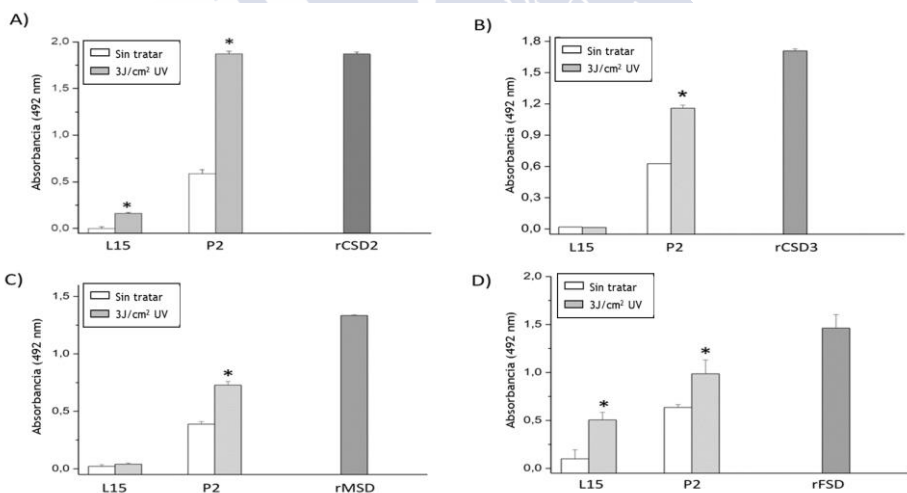


Fig. 7: ELISA para la determinación de los niveles de expresión de SODs en trofozoitos de *P. dicentrarchi* expuestos a radiación ultravioleta (barras gris claro) con respecto a ciliados no irradiados (barras blancas). En el ensayo, se utilizaron sueros anti-rCSD2 (A), anti-rCSD3 (B), anti-rMSD (C) y anti-rFSD (D) frente al pico 2 (P2) de la cromatografía de intercambio iónico y frente a medio de cultivo L15 para

determinar la presencia de formas extracelulares de las SODs. También se utilizaron las proteínas recombinantes (rCSD2, rCSD3, rMSD y rFSD) como controles (barras gris oscuro). Los valores se expresan como las medias \pm las desviación estándar. Los asteriscos indican las diferencias estadísticamente significativas (* $P < 0.01$).

La expresión de CSD3, tanto a nivel de proteína (Figura 8A) como a nivel transcriptómico (Figura 8B), depende de la dosis de irradiación administrada viéndose incrementada con un aumento de la radiación UV.

La exposición de los ciliados a condiciones de estrés oxidativo, a través de la generación química de O_2 en el medio de cultivo, causó un aumento significativo en la actividad enzimática SOD en los trofozoítos expuestos (Figura 8C).

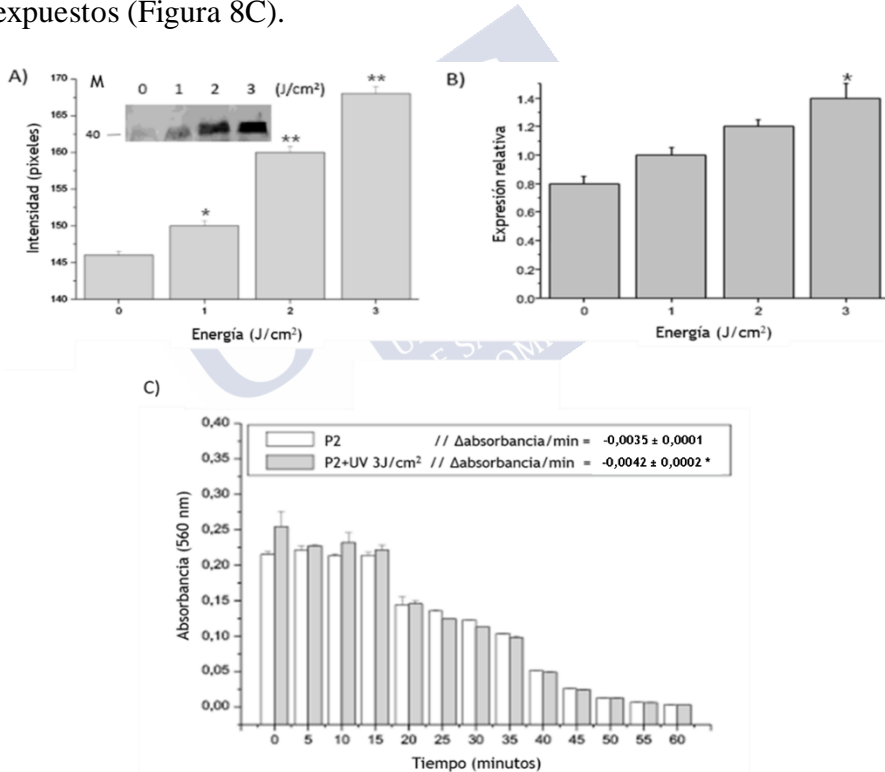


Fig. 8: A) Niveles de expresión del enzima CSD3 en ciliados de *P. dicentrarchi* expuestos a diferentes niveles de radiación UV a partir de un ensayo de Western Blot usando un anticuerpo policlonal contra la proteína recombinante rCSD3 (anti-rCSD3) frente a proteínas presentes en el pico 2 (P2) purificadas mediante cromatografía de

intercambio iónico. La gráfica corresponde al análisis densitométrico de las bandas obtenidas en el Western Blot realizado con el programa *Image J*. B) Nivel de expresión del gen Cu/ZnSOD3 con respecto al gen de referencia EF-1 α a partir de ADNc de ciliados expuestos a diferentes dosis de radiación UV cuantificado mediante qPCR. C) Determinación de la actividad SOD mediante el ensayo de fenosfosfato (PMS)-nitroazul de tetrazolio (NBT) en la fracción P2 de ciliados expuestos a 3J/cm² de radiación UV y ciliados no tratados (control). Los resultados de la actividad enzimática se cuantificaron como la disminución de la absorbancia a 560 nm/min (- Δ absorbancia/min). Las barras de los gráficos y los resultados de la prueba PMS-NBT expresan los valores medios \pm la desviación estándar y los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (* P <0.05; ** P <0.01) con respecto a los valores de ciliados no radiados (controles).

4.5. DISCUSIÓN

En los eucariotas, existen principalmente tres tipos de familias para las SODs basadas en la presencia de cofactores metálicos (Mn²⁺, Fe³⁺, Cu²⁺ o Zn²⁺) en sus sitios activos, en su ubicación en diferentes orgánulos o compartimentos celulares y en las diferentes sensibilidades a ciertos compuestos como el cianuro, la azida o el peróxido de hidrógeno (Hassan, 1989; James, 1994). En los geles de poliacrilamida nativa se observan bandas de actividad, las cuales corresponden a tres isoenzimas SOD presentes en un extracto soluble de *P. dicentrarchi* purificado por cromatografía de intercambio iónico. Inicialmente, la identificación de las SODs asociadas a cada banda se realizó en función de la sensibilidad de cada isoenzima a diferentes inhibidores. La actividad del isoenzima Cu/ZnSOD se identificó por su sensibilidad al NaCN (Manaa et al., 2014), mientras que la actividad del isoenzima FeSOD se identificó por su sensibilidad al H₂O₂ y al NaN₃ (Misra y Fridovich, 1978, Ma et al., 2017). El isoenzima MnSOD se identificó porque su actividad no fue inhibida por NaCN ni por H₂O₂ (Bartosz, 2005). Además, en el presente estudio, también se analizó el efecto del resveratrol (RESV). Este compuesto se ha descrito como inhibidor de la SOD en plantas a una concentración 10 μ M (Fan y Mattheis, 2006). Morais et al., ya describió en 2009 el efecto inhibitorio del RESV en la actividad de la SOD de *P. dicentrarchi* a una concentración de 100 μ M. Ahora hemos visto, de manera más específica, que el RESV inhibe ligeramente la actividad del isoenzima Pd-MnSOD y completamente la

actividad del isoenzima Pd-FeSOD, mientras que las isoenzimas Pd-Cu/ZnSOD son insensibles a este polifenol.

Con el fin de identificar las secuencias de proteínas de las enzimas de la familia Pd-SOD, realizamos un análisis transcriptómico a partir de un ensayo RNA-seq para localizar las secuencias que presentan homología con estas enzimas y realizar una identificación molecular. Aunque inicialmente se creía que los protozoos carecían de genes que codifican para la isoenzima Cu/Zn-SOD (Wilkinson et al., 2006; Miller, 2012), varios estudios muestran su existencia y actividad en estos organismos unicelulares, incluidos los ciliados (Ferro et al., 2015). En este estudio, detectamos la presencia en *P. dicentrarchi* de tres secuencias diferentes que codifican para las Cu/ZnSOD. La existencia de varias formas de Cu/ZnSOD es un fenómeno frecuente entre los ciliados. En *Tetrahymena thermophila* se han identificado tres genes para las Cu/ZnSOD que codifican enzimas con PM entre 17,9 y 21,4 kDa, en *Euplotes focardii* dos genes que codifican proteínas con PM entre 16,8 y 20 kDa, y en *Oxytrichia trifallax* dos genes que codifican proteínas con PM entre 17,5 y 17,6 kDa (Ferro et al., 2015). Además, en *Euplotes crassus* se han identificado dos tipos de Cu/ZnSOD, presentando una de ellas péptido señal para la actividad extracelular (PM 17,3 kDa y pI de 4.98) (Kim et al., 2018). A partir del análisis bioinformático hemos visto que la proteína CSD2, codificada por el gen Pd-Cu/ZnSOD2, también tiene un péptido señal relacionado con una función de actividad extracelular; mientras que la proteína CSD3 tiene una región transmembrana, lo cual indica que está asociada a membranas. En el nematodo *Caenorhabditis elegans* se describen isoformas Cu/ZnSOD, las cuales se detectaron por su homología con los tipos de Cu/ZnSOD extracelulares en mamíferos, que presentan péptido señal en sus extremos N y que fueron asociadas con membranas al presentar un dominio transmembrana en la región C-terminal (Fujii et al., 1998). Otros parásitos, como el helminto *Schistosoma mansoni*, también tiene formas extracelulares de Cu/ZnSOD que presentan péptido señal y regiones transmembrana. En este mismo parásito, también se ha observado la presencia de cuatro variantes en el pI en adultos, pero en todos los casos el pI de las formas Cu/ZnSOD es

ligeramente ácido (Hong et al., 1992). En el caso de Pd-Cu/ZnSODs, CSD1 presenta pI ácido, mientras que CSD2 y CSD3 tienen pI alcalino, lo que indica que las formas citoplasmáticas tienen pIs ácidos, mientras que las formas extracelulares o asociadas con membranas tienen pI alcalino. La existencia de formas extracelulares con pI alcalino también se ha descrito en plantas, donde las formas extracelulares de las Cu/ZnSOD tienen un pI más alto que las formas citosólicas (Streller et al., 1994, Schinkel et al., 1998). Por otro lado, con el análisis bioinformático, también se ha visto que las tres formas Pd-Cu/ZnSOD presentan interfaces diméricas tanto de clase E como de clase P, lo cual es una característica molecular de las enzimas Cu/ZnSOD (Bourne et al., 1996). El modelo de las proteínas codificadas por los tres genes asociados con Pd-Cu/ZnSOD indica que se tratan de proteínas oligoméricas de tipo homodímero, lo que indica que las enzimas nativas tienen una masa molecular entre 34 y 44 kDa. En la mayoría de los organismos eucariotas, las Cu/ZnSOD se presentan como enzimas homodímeras (James, 1994; Desideri y Falconi, 2003). En el ciliado marino *Euplotes focardii* o en la ameba *Acanthamoeba castellanii* las enzimas Cu/ZnSOD son homodiméricas (Choi et al., 2000; Pischdda et al., 2018). La baja homología encontrada entre las secuencias de aa de Cu/ZnSOD en *P. dicentrarchi* parece indicar que los genes que codifican estas proteínas derivan de la expresión de genes parálogos, tal y como ocurre en ciertas arqueobacterias (Joshi y Dennis, 1993).

Las isoenzimas FeSOD y MnSOD son evolutivamente más antiguas por lo que, probablemente, estas enzimas evolucionaron a partir de genes ortólogos (Alscher et al., 2002). Fe-SOD se ha localizado en procariotas y en cloroplastos, mientras que el enzima MnSOD ha sido descrito tanto en organismos procariotas como eucariotas, donde se ha localizado en la matriz mitocondrial (Pischdda et al., 2018). Se ha sugerido que el hierro puede haber sido el primer metal utilizado como cofactor asociado con el sitio activo de la primera SOD debido a su abundancia en ese momento en forma de Fe^{2+} soluble (Bannister et al., 1991). Las MnSOD han sido descritas en *Euglena gracilis* (Kanematsu et al., 1979) y en los ciliados *E. focardii* y *E. crassus* (Kim et al., 2018; Pischdda et al., 2018). FeSOD ha sido

considerada originalmente como una enzima citosólica en bacterias; sin embargo, también se ha detectado en cloroplastos de plantas, así como en el citosol, en los glicosomas y en las mitocondrias de algunos protistas (Sheng et al., 2014). Las FeSOD son comunes en los protozoos (*Entamoeba histolytica* (Loftus et al., 2005), *Tetrahymena pyriformis* (Barra et al., 1990), *Plasmodium falciparum* (Bécuwe et al., 1996), *Leishmania chagasi* (Plewes et al., 2003), *Perkinsus marinus* (Schott y Vasta, 2003; Asojo et al., 2006), *Trichomonas vaginalis* (Mittra et al., 2017)), predominando en organismos anaerobios o microaerofílicos; mientras que en los aerobios predomina la isoenzima MnSOD (Bartosz, 2005). La presencia de una forma de FeSOD en *P. dicentrarchi* podría ser una adaptación a su microaerofilia y sensibilidad a bajas concentraciones de oxígeno al tratarse de un organismo bentónico (Hayward et al., 2003). La isoenzima Pd-MnSOD posee cuatro sitios de enlace a Mn, al igual que otras MnSOD de eucariotas (Rosso, 2009). En bacterias y eucariotas Fe y MnSOD existen tanto en forma homodimérica como en forma homotetramérica con subunidades de 22 kDa (Beyer et al., 1991; Sheng et al., 2014); sin embargo, en *P. dicentrarchi*, al igual que en protozoos dinoflagelados del género *Symbiodinium* o el apicomplejo *P. falciparum*, tanto Pd-MnSOD como Pd-FeSOD, representan formas diméricas (Boucher et al., 2006; Krueger et al., 2015). Por el contrario, el enzima FeSOD aislada del ciliado *T. pyriformis* es tetramérica (Barra et al., 1990). En parásitos como *T. vaginalis*, la enzima FeSOD es una proteína dimérica que tiene una alta conservación estructural con la FeSOD de los procariotas, lo que parece sugerir que su presencia en los eucariotas puede deberse a un proceso endosimbiótico (Viscogliosi et al., 1998). Tanto la proteína CSD3, asociada con la isoenzima Pd-Cu/ZnSOD3, como la proteína FSD, relacionada con el isoenzima Pd-FeSOD, están relacionadas filogenéticamente con las SODs de otros ciliados, especialmente con las del escuticociliado *Pseudocohnilembus persalinus* (Xiong et al., 2015).

Las enzimas bimetálicas SOD que contienen cobre y zinc son una familia de isoenzimas que se encuentran en ubicaciones tanto intracelulares como extracelulares. Estas enzimas se encuentran en varios compartimentos intracelulares, principalmente en el citosol, pero

también en el espacio intermembrana mitocondrial, la vía secretora e incluso el núcleo (Robinett et al., 2017). Los ciliados pertenecen al Superfilo Alveolata (Adl et al., 2005). Los organismos que conforman este grupo comparten una organización ultraestructural común formada por una serie de sacos aplanados llamados alveolos o sacos parasómicos que sostienen la membrana plasmática y que constituyen el epiplasma (Gould et al., 2010; Aubusson-Fleury et al., 2013). Tanto la predicción bioinformática como los resultados de la inmunofluorescencia indican que la forma Pd-Cu/ZnSOD3 se encuentra en el espacio de los sacos alveolares, de manera similar a las enzimas Cu/ZnSOD de bacterias que se encuentran en el periplasma (Battistoni et al., 2000). Según el análisis bioinformático, Pd-Cu/ZnSOD1 se ubica en el citosol, mientras que Pd-Cu/ZnSOD2 es extracelular. En los eucariotas, la presencia de formas Cu/ZnSOD citosólicas y extracelulares es muy común (Crapo et al., 1992; Broxton y Culotta, 2016). Además, la presencia de un péptido señal en Pd-Cu/ZnSOD2 confirma que se trata de un enzima extracelular. Es lógico pensar que las SODs presenten ubicaciones extracelulares ya que el anión superóxido generalmente no atraviesa las membranas biológicas y el sustrato para la enzima debe originarse fuera de la célula (Robinett y Culotta, 2017).

El análisis de la secuencia de 220 aa, correspondiente a MSD, a través de la herramienta Blastp, indica que esta enzima posee la identidad más alta con una proteína superóxido dismutasa [Fe] en *T. thermophila* SB210 y con una Mn/FeSOD en el escuticociado *P. persalinus* (Xiong et al., 2015). Fe y MnSOD se encuentran en una amplia variedad de especies y pueden localizarse en el citosol, en las mitocondrias o en ambos; sin embargo, en mamíferos la enzima MnSOD suele estar presente en las mitocondrias (Miller et al., 2012). En las células eucariotas, la enzima MnSOD se codifica en el núcleo, se sintetiza en el citosol y se envía, después de la traducción, a la matriz de las mitocondrias, donde se consume el 90% del oxígeno en las células (Halliwell y Gutteridge, 1989). Los resultados de la inmunofluorescencia indican que la proteína MSD se encuentra en las mitocondrias. Además, los resultados del análisis informático que muestran que la proteína MSD presenta una señal de exportación a las

mitocondrias y una posible estructura homodimérica, junto con su tamaño molecular predicho y su insensibilidad a la inhibición por H_2O_2 y NaN_3 , confirman que se trata de una isoenzima MnSOD con localización mitocondrial. Con respecto a la secuencia de 249 aa, asociada a FSD, el análisis de identidad realizado con una base de datos de *Tetrahymena thermophila*, mostró que esta proteína presenta máxima identidad con una enzima FeSOD de *T. borealis* y con una enzima Mn/FeSOD de *Oxtrichia*. Estos resultados también coinciden con la predicción del programa bioinformático InterPro que indica que esta proteína tiene un péptido señal, carece de regiones transmembrana y posee dominios de la familia Mn/FeSOD. Además, teniendo en cuenta el tamaño de la forma homodimérica de esta proteína, su insensibilidad al cianuro y la sensibilidad a la azida indican que se trata de una FeSOD (Viscogliosi et al. 1998). Aunque la predicción subcelular de proteínas con la herramienta bioinformática LocTree indica que esta proteína en los eucariotas se encuentra en las mitocondrias, teniendo en cuenta su similitud con las bacterias (donde se encuentra en el citoplasma) y los resultados de la inmunofluorescencia se refuerza la hipótesis de que esta proteína es en *P. dicentrachi* una FeSOD citoplásmica. La presencia de FeSOD citoplásmica también se ha detectado en amebas de vida libre (Choi et al., 2000) o en individuos del género *Trypanosoma* (Boucher et al., 2006); aunque la presencia de enzimas FeSOD en la mitocondria también se ha detectado en otros protistas y levaduras (Schott y Vasta, 2003).

En el ambiente marino, donde habitan los ciliados de vida libre, se dan una gran variedad de cambios ambientales que pueden dar lugar a un alto nivel de estrés oxidativo (Lesser, 2006; Pischedda et al., 2018). Además, durante la infección, los ciliados también deben enfrentarse a altos niveles de ROS generados por las células del sistema inmunitario innato del hospedador (Leiro et al., 2004). Entre los factores más importantes que pueden intervenir, desde el punto de vista ambiental, en la generación de altos niveles de ROS se encuentran: la temperatura, el exceso de oxígeno en el agua, la radiación solar UV y la presencia de algunos contaminantes (Lushchak, 2011; Pischedda et al., 2018). En el cultivo de peces en piscifactorías con circuito de agua abierto es común oxigenar el agua mediante el suministro directo de O_2 o mediante

aireación y aplicar sistemas de desinfección con radiación UV (Summerfelt, 2003; Sultana et al., 2017). Para sobrevivir, los organismos marinos han desarrollado el uso de enzimas SOD que les permiten eliminar, no solo los aniones superóxido endógenos producidos durante los procesos metabólicos (incluida la respiración mitocondrial), sino también los exógenos presentes en ambientes con altos niveles de estrés oxidativo (Miller, 2012). A partir de los resultados obtenidos en el presente estudio, se ha visto que los niveles de expresión de todas las formas de las SODs de *P. dicentrarchi* aumentan significativamente después de la exposición de los ciliados a la radiación UV. También se ha observado que tanto Pd-Cu/ZnSOD2 como Pd-FeSOD se excretan al medio de cultivo después de la irradiación con UV, lo que indican la existencia de formas extracelulares. En ambos casos, aunque la predicción inicial de localización celular fue citosólica, la existencia de péptidos señal en ambas isoenzimas parece confirmar que estas proteínas pueden secretarse al exterior, participando en la neutralización del O₂ extracelular generado por la radiación UV. En mamíferos también se ha descrito una Cu/ZnSOD y una FeSOD extracelular inducida bajo estrés oxidativo (Strålin y Marklund, 1994). También se han identificado enzimas Cu/ZnSOD citosólicas y extracelulares en varios parásitos (Tang et al., 1994; Liddell y Knox, 1998; Kim et al., 2000). En individuos del género *Phytomonas* también se ha detectado la secreción de FeSOD, la cual además presenta capacidad inmunogénica (Marin et al., 2006). La expresión, tanto a nivel de proteína como a nivel de genes, de Pd-Cu/ZnSOD aumenta al incrementarse la exposición a radiación UV. La actividad enzimática también aumenta significativamente a la dosis más alta de radiación UV no letal.

Por lo tanto, *P. dicentrarchi* posee los tres tipos característicos de SOD presentes en los eucariotas: Cu/ZnSODs, MnSOD y FeSOD que, en su forma funcional, son enzimas oligoméricas de tipo homodimérico. Hay tres tipos de enzimas Pd-Cu/ZnSOD con secuencias de aminoácidos muy diferentes y sensibles al NaCN; localizándose dos de ellas en el citosol y una en el espacio de los sacos alveolares. También, se han identificado otras dos isoenzimas: una MnSOD mitocondrial

insensible a H_2O_2 y NaN_3 , y una FeSOD citosólica sensible a H_2O_2 y NaN_3 . Una de las formas citosólicas de Pd-Cu/ZnSOD y la forma FeSOD tienen señales de secreción fuera de la célula. La actividad de todas las isoenzimas SOD aumenta en condiciones de estrés oxidativo inducido por la radiación UV. A partir de este estudio se destaca el papel de las SOD como enzimas que permiten que el ciliado se defienda de la acción tóxica del O_2 generado tanto en el ambiente marino, durante su fase de vida libre, como en el hospedador, durante la fase parasitaria. Dado que la viabilidad del ciliado en condiciones de estrés oxidativo depende de la actividad de estas metaloenzimas y que estas son muy diferentes a las del rodaballo, las SOD de *P. dicentrarchi* podrían representar un objetivo terapéutico importante para el desarrollo de fármacos inhibidores y para la generación de vacunas contra las formas extracelulares de las enzimas.





Capítulo 5

PAPEL DE LOS EXTRUSOMAS COMO MECANISMO DE EVASIÓN DEL CILIADO

5.1. RESUMEN

La exposición de los trofozoítos del parásito escuticociliado del rodaballo *Philasterides dicentrarchi* a un suero inmune, que contiene anticuerpos específicos, da lugar a la aglutinación / inmovilización de los ciliados y, transcurrido un determinado periodo de tiempo, se produce la aparición de cápsulas vacías desde donde los ciliados emergen. Para analizar este fenómeno, se llevaron a cabo estudios de microscopía que permitieron asociar la aparición de estas cápsulas con procesos de exocitosis relacionados con la liberación de material compuesto, al menos parcialmente, por glicoproteínas tipo mucina, a partir de los extrusomas. Este material se deposita en la superficie de los ciliados, del cual son capaces de zafarse por acción de las proteasas, quedando tras de sí las cápsulas vacías. La expresión tanto de genes como de proteínas asociadas a los extrusomas aumenta con el tiempo de exposición a los anticuerpos de rodaballo. La estimulación con el suero inmune también se asocia a un aumento en la descarga de los compartimentos de almacenamiento intracelulares de calcio necesario para los procesos de exocitosis de los extrusoma. Los resultados obtenidos sugieren que *P. dicentrarchi* utiliza el mecanismo de extrusión para generar una barrera de protección física contra el ataque de los factores solubles del sistema inmune humoral del hospedador. El desarrollo de moléculas que interfieren con este proceso exocítico, así como el conocimiento de las proteínas implicadas, puede contribuir al futuro desarrollo de fármacos y vacunas recombinantes glicosiladas que permitan una prevención y control efectivo de la escuticociliatosis en el rodaballo.

5.2. INTRODUCCIÓN

Los ciliados, como todos los eucariotas, poseen una compleja red de orgánulos que facilitan tanto la captación como la secreción macromolecular. Las vías endocíticas y exocíticas subyacentes son mediadores clave de la interacción de una célula con su entorno y, por lo tanto, pueden mostrar adaptaciones específicas en función de las condiciones que rodean al microorganismo. La exocitosis, o la fusión de vesículas citoplásmicas con la membrana plasmática, se produce a través de varias rutas. La liberación de estas vesículas o su contenido puede estar desencadenada por un estímulo extracelular. Aquellos orgánulos que permiten la liberación de sustancias al exterior celular se denominan extrusomas. Estas estructuras presentan un modo de secreción en el que las vesículas especializadas se acumulan primero en el citoplasma, pudiendo extruir su contenido a través de la fusión de la membrana, exocitosis regulada, en respuesta a señales extracelulares como estrategias de defensa o depredación (Rosati y Modeo, 2003; Taylor y Sanders, 2010). En los ciliados se han descrito distintos tipos de extrusomas en función de la naturaleza del material que liberan. Los toxicistos contiene material tóxico y los haptocistos liberan material capaz de penetrar a ciertas presas. Ambos orgánulos tienen una función depredadora basada en la captura y absorción de alimento (Benwitz, 1984; Ricci et al., 1996). Sin embargo, la mayoría de los extrusomas descritos en ciliados pertenecen al grupo de los tricocistos, los cuales se caracterizan por presentar una morfología en forma de huso y ser capaces de descargar rápidamente su contenido a modo de proyectil en respuesta a estímulos mecánicos o físicos, como mecanismo de defensa (Haacke-Bell et al., 1990; Modeo et al., 2001). También se ha descrito un cuarto grupo de extrusomas en ciliados denominados mucocistos. Estos orgánulos exocitan un material protector, amorfo y mucilaginoso, en la superficie celular que, en algunas especies, puede estar implicado en la formación de quistes o en la formación de cápsulas temporales, y que constituye una primera línea de defensa del ciliado contra los depredadores, la regulación de la concentración iónica celular y el anclaje de células a sustratos (Haacke-Bell et al., 1990; Sauer y Kelly, 1995; Miyake et al., 2003; Fyde et al., 2006).

Como se comentó anteriormente, *Philasterides dicentrarchi* es un escuticociliado de vida libre que, bajo ciertas condiciones, puede transformarse en un parásito oportunista histiófago en peces planos de cultivo (Iglesias et al., 2001; De Felipe et al., 2017) dando lugar a altas mortalidades por escuticociliatosis. Para el desarrollo de la fase parasitaria, el ciliado debe desarrollar diversas estrategias de adaptación bioquímica a su nuevo hábitat (Mallo et al, 2013.; Mallo et al., 2016), además de evadir el ataque del sistema inmunitario del pez, especialmente la acción lítica de factores solubles del suero como el complemento (activado por la ruta clásica, mediada por anticuerpos) y la activación del sistema de coagulación (Piazzon et al., 2011a; Piazzon et al., 2014; Blanco-Abad et al., 2018). En 2003a, Iglesias observó que el suero de rodaballos que habían sobrevivido a un brote natural de escuticociliatosis causó la aglutinación y la inmovilización de trofozoítos y que, después de 2 horas de incubación con el suero, se apreciaban numerosas cápsulas vacías y ciliados saliendo de ellas. La interpretación de este fenómeno se basó en un posible cambio antigénico y en un mecanismo de evasión de la respuesta inmune humoral. En *P. dicentrarchi* se han descrito dos tipos de extrusomas: uno con morfología fusiforme (tricocisto) y otro con morfología esférica (mucocistos); este último capaz de liberar una delgada capa mucilaginosa en la superficie celular del ciliado (Dragesco et al., 1995; Paramá et al., 2006).

En el presente estudio se pretende dilucidar con mayor precisión el papel de los extrusomas en la producción de cápsulas después de la incubación de los trofozoítos de *P. dicentrarchi* con sueros inmunes de rodaballos vacunados que producen anticuerpos aglutinantes e inmovilizadores; así como caracterizar las proteínas que generan los tricocistos y los mucocistos, y demostrar el papel de este proceso de exocitosis como mecanismo de defensa del ciliado contra el ataque de los factores solubles del sistema inmune humoral del hospedador.

5.3. MATERIAL Y MÉTODOS

5.3.1. Inmunización de los rodaballos

Los rodaballos se inmunizaron mediante inyección intraperitoneal (i.p.) en los días 0 y 30 con 200 μ l (por pez) de una emulsión que contenía 10^6 ciliados/mL, inactivados con un 0,2% de formalina y adyuvante Montanide ISA 763 A VG (Seppic, Francia) 1:1 (v/v) (Lamas et al., 2008). Las muestras de sangre se obtuvieron, después de anestesiar los peces, mediante punción de la vena caudal el día 60, se dejaron coagular durante 2 h a temperatura ambiente y después se centrifugaron a 2000 x g durante 10 minutos. El suero (suero inmune de rodaballo, SIR) se almacenó a -20 °C hasta su uso.

5.3.2. Ensayos de inmunización/aglutinación

Los ciliados, procedentes de un cultivo, se lavaron 3 veces en medio incompleto L-15 y se dispusieron en microplacas de 96 pocillos (Corning, EE.UU.) (200 ciliados por pocillo en un volumen final de 50 μ l de medio incompleto L-15). El suero inmune de rodaballo se inactivó con calor a 45 °C durante 20 min y, posteriormente, se incubó con los ciliados a concentraciones 1/25, 1/50 y 1/100 por triplicado y a temperatura ambiente. Se llevó a cabo un seguimiento del estado de los ciliados mediante visualización al microscopio invertido Nikon Eclipse TE300 (Nikon, Japón) a los 15, 30 y 60 min para las respuestas de inmovilización / aglutinación. En todos los ensayos, se incluyó un control de ciliados en medio incompleto L-15 en ausencia de suero. La respuesta de aglutinación se expresó como porcentaje de ciliados aglutinados.

5.3.3. Análisis microscópico

5.3.3.1. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Ciliados controles y tratados con SIR se concentraron por centrifugación a 1000 x g durante 5 min y se fijaron durante 30 minutos en una solución fría de paraformaldehído al 4% y glutaraldehído al 2,5 % en tampón fosfato 0,1 M, pH 7.4. Transcurrido este tiempo se post-fijaron durante 30 minutos con OsO_4 al 1 % (p/v) en tampón fosfato 0,1 M, pH 7.4. Posteriormente, las muestras se lavaron tres veces con agua destilada y se deshidrataron en una batería de alcoholes de

concentración ascendente (5 minutos en cada una de las siguientes concentraciones: 50%, 70%, 90%, 95%, y etanol absoluto). Finalmente, se secaron de forma química con HMDS, se recubrieron con iridio mediante pulverización catódica, utilizando el equipo Q150T-S Sputter (Quorum Technologies, Reino Unido), y se observaron y fotografiaron en el microscopio electrónico de barrido Zeiss FESEM Ultra Plus (Zeiss, Alemania).

5.3.3.2. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Para la realización de TEM se siguió la técnica descrita en el apartado 4.3.6.2.

5.3.3.3. Histoquímica: tinción con Safranina O

Para la detección de proteínas de tipo mucina, se llevó a cabo una tinción con Safranina O. Los ciliados, controles y tratados, se fijaron en formaldehído al 10% en tampón fosfato salino (PBS: 0,01 M Na_2HPO_4 ; 0,0018 M KH_2PO_4 ; 0,0027 M KCl; 0,137 M NaCl; pH 7,0). Después de la fijación, las muestras se lavaron 2 veces con agua destilada y se incubaron durante 5 min con una solución acuosa de Safranina O al 0,1%. Después de un lavado exhaustivo con agua para eliminar el exceso de tinción, la preparación se secó al aire y se montó utilizando un medio permanente (Entellan[®], Merck) para ser visualizada al microscopio óptico.

5.3.4. Análisis bioinformático de las secuencias de los extrusomas

A partir de los estudios de secuenciación del genoma (apartado 4.3.3.) y del transcriptoma de la cepa de II de *P. dicentrarchi* (De Felipe, 2008) se seleccionaron aquellas secuencias que codifican proteínas en una relación potencial con tricocistos de ciliados. Las proteínas seleccionadas asociadas con los extrusomas fueron: *P. dicentrarchi trichocyst matrix protein T2A* (TMPT2A) (número de acceso GenBank: MH412657.1) y *P. dicentrarchi trichocyst matrix protein T4B* (TMPT4B) (número de acceso GenBank: MH412658.1).

Las secuencias de aminoácidos obtenidas para las proteínas TMPT2A y TMPT4B fueron alineadas utilizando el programa Clustal Omega (Sievers et al., 2011). La historia evolutiva se dedujo utilizando el método de máxima probabilidad (Maximum Likelihood) con el programa Mega7 (Zuckermandl y Pauling, 1965; Kumar et al., 2016).

Para la síntesis de proteínas recombinantes en levadura se utilizó el kit comercial *K. Lactis* Protein Expression kit (New England Biolabs, UK), como se describió anteriormente (apartado 4.3.5.). Los cebadores se diseñaron a partir de las secuencias para las proteínas TMPT2A y TMPT4B obtenidas a partir de los datos del RNA-Seq.: FT2AKI 5'-CGCCTCGAGAAAAGAatgcgtgtctgaccgcacta-3' / RT2AKI 5'-ATAAGAATGCGGCCGCTTAATGATGATGGTGATGGTGTATGA TGTTGATGatcggcacgctttacgtcg-3' / FT4BKl 5'-CGCCTCGAGAAAAGAatgaagagagttagtata-3' /RT4BKl 5'-ATAAGAATGCGGCCGCTTAatgatggtgatgatgatg-3'.

Se siguió el protocolo descrito en el apartado 4.3.6.1., utilizando como antígeno las proteínas recombinantes r-TMPT2A o r-TMPT4B, respectivamente (5 ratones por grupo). Los sueros se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

5.3.7. Caracterización de las proteínas recombinantes mediante electroforesis bidimensional (2-DE) y Western Blot

El análisis de las proteínas recombinantes TMPT2A (r-TMPT2A) y TMPT4B (r-TMPT2B) se llevó a cabo mediante geles 2-DE. Para la primera dimensión o isoelectroenfoque, 1 mg de proteína, tratada previamente con el kit comercial ReadyPrep™ 2-DEcleanup (Biorad), se cargó en una tira de gradiente de pH inmovilizado (IPGs) de 7 cm y pH 4-7. La tira se colocó con la matriz del gel en contacto con la muestra, evitando la formación de burbujas, y se cubrió con aceite mineral para evitar evaporaciones y prevenir la cristalización de la urea. La rehidratación se llevó a cabo de forma pasiva y en posición horizontal, dejando la tira en contacto con la muestra durante 12 h a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se inició el isoelectroenfoque en el equipo Protean® i12™ IEF cell (BioRad) con un programa en gradiente.

Posteriormente, la tira se incubó durante 15 minutos en una solución de DTT al 1% en tampón de equilibrado (6 M urea; 50 mM Tris; 2% SDS; 30% glicerol) y, a continuación, 15 minutos en una solución de iodoacetamida al 2,5% en tampón de equilibrado.

La segunda dimensión se llevó a cabo mediante electroforesis en SDS-PAGE. La tira de IPG sobre la superficie de un gel al 12,5% de acrilamida y se añadió un marcador de peso molecular (apartado 4.3.6.4.). La parte superior de la tira se selló con una solución de agarosa al 1% en tampón de recorrido y trazas de azul de bromofenol. El gel se colocó en una cubeta y se realizó la segunda dimensión aplicando 120 V a 15 °C (González-Miguel et al., 2011).

Por último, las proteínas del gel se transfirieron a una membrana de PVDF y se llevó a cabo el Western Blot (como se describió anteriormente en el apartado 4.3.6.4.) con los sueros de ratón anti-r-TMPT2A o anti-r-TMPT4B diluidos a una concentración 1:200 en TBS-T 0,2%.

5.3.8. Ensayos inmunológicos para el análisis de la expresión de proteínas de los extrusomas

5.3.8.1. Ensayo fluorescente de inmunoabsorción ligado a enzimas (FELISA)

Para la cuantificación de la expresión de la proteína TMPT2A en trofozoítos control o incubados con suero inmune de rodaballo durante 30 min y 6h se realizó un FELISA en microplacas de ELISA (High binding Greiner Bio-One, Germany), como ha descrito previamente Mallo et al. (2016). Para ello, se utilizaron ciliados lisados (1 µg por pocillo) como antígeno, preparado como describió previamente Iglesias et al. (2003a), en 100 µl de tampón carbonato-bicarbonato pH 9,6. Las placas se incubaron 12 horas a 4 °C. Los pocillos se lavaron tres veces con tampón TBS (Tris 50 mM, NaCl 0,15 M, pH 7,4) que contenía un 0,05% de Tween 20 (TBS-T 0,05%). Posteriormente, los pocillos se bloquearon con leche desnatada en polvo al 5% en tampón TBS con un 0,2% de Tween 20 (TBST-T 0,2%) durante 1 h. Transcurrido este tiempo los pocillos se volvieron a lavar 3 veces y, a continuación, se incubaron durante 30 min a 37 °C en un agitador de microplacas a 750 rpm con suero de ratón anti-r-TMPT2A en TBS-T 0,2% a una dilución 1:100. A continuación, se lavaron los pocillos 3 veces con TBS-T 0,05% y se incubaron con anticuerpo secundario cabra anti-ratón con acoplamiento de Ig a FITC (DAKO, Dinamarca), dilución 1:500 en TBST-T 0,2%, durante 1 hora en agitación y en oscuridad. Por último, los pocillos se lavaron cinco veces con TBS-T 0,05% y la fluorescencia se midió en un lector de microplacas (Bio-Tek Instruments, EE.UU.) con una longitud de onda de excitación de 490 nm, longitud de onda de emisión de 525 nm y una sensibilidad del 70%. Los resultados se expresaron en unidades arbitrarias de fluorescencia.

Mediante este mismo ensayo se analizaron los niveles de proteasas en las mismas muestras. En este caso se utilizó el anticuerpo primario anti-proteasas a una dilución 1:400. Este suero fue obtenido mediante la inmunización de ratones con proteasas de *Philasterides dicentrarchi* purificadas mediante una cromatografía de afinidad con sefarosa acoplada a bacitracina (Paramá et al., 2007b).

5.3.8.2. Western Blot

Para realizar al Western Blot se siguió el protocolo explicado anteriormente en el apartado 4.3.6.4. Tras separar las proteínas de ciliados incubados con suero inmune de rodaballo (10 minutos y 6 horas) y ciliados control mediante SDS-PAGE (es este caso el tampón de carga contenía DDT 0,6M y las muestras fueron hervidas durante 5 minutos antes de ser cargadas en los pocillos), se procedió a la transferencia de estas a una membrana de PVDF. Posteriormente, la membrana se bloqueó y se incubó con suero anti-r-TMPT2A o anti-r-TMPT4B diluido en TBS-T 0,2% a una concentración 1:200 y se incubó durante toda la noche a 4 °C en agitación. Al día siguiente, y tras los correspondientes lavados, se añadió el anticuerpo secundario y las bandas se revelaron con DAB (Sigma-Aldrich).

5.3.8.3. Inmunofluorescencia y microscopía confocal

Para la inmunolocalización de las proteínas de tipo mucina se realizó un ensayo de inmunofluorescencia (apartado 4.3.6.3.) sobre ciliados incubados con SIR a distintos tiempos y utilizando el suero de ratón anti-r-TMPT2A a una dilución 1:100 en PBS. Una vez montadas, las muestras se visualizaron mediante microscopía confocal (Leica TCS SP2, Leica Microsystems, Alemania). Para este ensayo se realizaron en paralelo controles de ciliados sin tratar con suero inmune de rodaballo, ciliados incubados con suero pre-inmune de ratón y ciliados sin anticuerpo primario.

5.3.9. RT-qPCR

10⁶ trofozoitos/ml de *P. dicentrarchi* se incubaron durante 10, 60 y 240 min con suero inmune de rodaballo a una dilución de 1:50 en medio incompleto L-15. En algunos experimentos, los ciliados se incubaron durante 240 min con clorhidrato de dibucaína (Sigma-Aldrich) a una concentración 500 µM. La extracción de ARN y la posterior síntesis de ADNc se llevó a cabo como se describe en el apartado 4.3.7.2.; al igual que el diseño de los cebadores y la realización de la qPCR.

En este caso, para la amplificación de ADNc se utilizaron cebadores específicos para el gen TMPT2A (FTMPT2 / RTMPT2) 5'-
 ATTTGCTTGCGTTCTCGTCT-3' / 5

'TCATCTTCGTCTTGGGCTCT-3'; y para el gen TMPT4B (FTMPT4 / RTMPT4) 5'-CCACGAGAGATGGGTAGAGG-3' / 5 'AATTCAATCTGGTGGCCAAT-3'.

5.3.10. Análisis de la liberación intracelular de Ca^{2+}

La liberación de Ca^{2+} intracelular después de la interacción de los ciliados con suero inmune de rodaballo se analizó usando el kit comercial Fluo-4NW calcium assay kit (Life Technologies). 2×10^5 trofozoítos se lavaron dos veces mediante centrifugación con solución salina equilibrada de Hanks (HBSS sin Ca^{2+} , Mg^{2+} ni rojo fenol) y se resuspendieron en el tampón de ensayo (HBSS, HEPES 20 mM y probenecid 2,5 mM) a una concentración final de $1,25 \times 10^6$ ciliados/ml. A continuación, en microplacas de 96 pocillos, se añadió suero inmune de rodaballo (a una concentración 1:50) y la sonda Fluo-4 NW (siguiendo las instrucciones del fabricante), a los ciliados dispuestos en los pocillos (200 μl por pocillo). Finalmente, la fluorescencia se midió en un fluorímetro (FLx800, BioTek, EE.UU.) (Ex: 494 nm, Em: 516 nm). Se establecieron controles negativos sin suero inmune de rodaballo.

5.4. RESULTADOS

5.4.1. Cambios morfológicos que se producen en los ciliados al incubarlos con suero inmune de rodaballo

La inmunización de rodaballos con ciliados inactivados genera altos niveles de anticuerpos en el suero del pez. Estos son suficientemente elevados como para producir la aglutinación/inmovilización de los ciliados que se incuban con este suero de una manera rápida, ya que a los 30 minutos de incubación se observan grupos de ciliados. Con el paso del tiempo, el número de ciliados aglutinados / inmovilizados es mayor, hasta alcanzar niveles máximos a la hora de incubación (Figura 1). Antes de incubar los ciliados con el suero inmune, este fue inactivado para evitar la acción lítica del complemento y así analizar únicamente aquellos procesos que se producen por la acción de los anticuerpos durante la aglutinación/inmovilización de los trofozoítos.

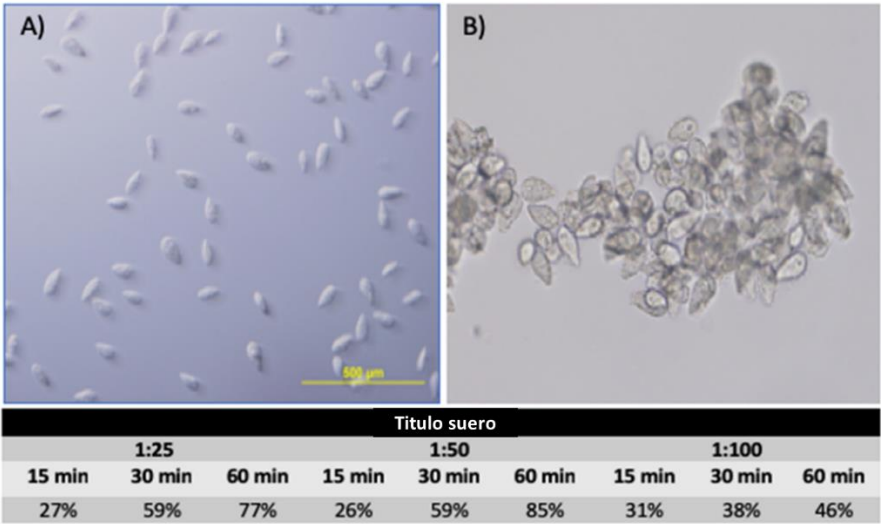


Fig. 1: Microfotografías al microscopio óptico con contraste de fase de trofozoítos de *P. dicentrarchi* incubados durante 60 minutos con suero pre-inmune (A) o con suero inmune de rodaballo (B). La tabla inferior muestra el efecto del suero inmune de rodaballo usado a diferentes diluciones y tiempos de incubación en la aglutinación de ciliados medidos en porcentaje.

La presencia de anticuerpos aglutinantes hace que los ciliados comiencen a generar una cubierta mucilaginosa que resulta más evidente a medida que aumenta el tiempo de incubación con el suero inmune. Transcurridas 2 horas se empiezan a observar una especie de cápsulas que parecen tener la forma del ciliado pero que realmente se encuentran vacías. El número de estas cápsulas aumenta con el tiempo de incubación. En estas estructuras vacías se pudo intuir la forma de los ciliados, ya que en algunas se aprecian las marcas de las cinetias del parásito a modo de huella. Además, se han observado, en la proximidad de estas cápsulas, ciliados que parecen salir de ellas de manera intacta (Figura 2).

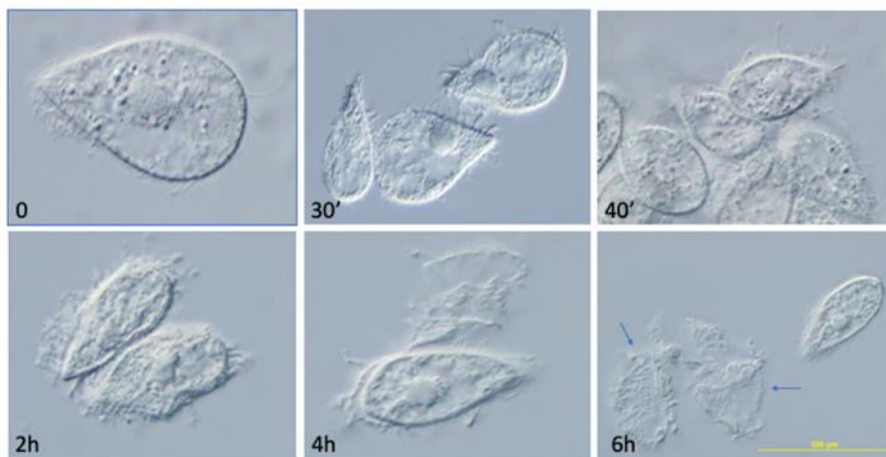


Fig. 2: Microscopía de contraste interferencial (DIC) de Nomarski que muestra la secuencia de la evolución de la aglutinación de los trofozoítos de *P. dicentrarchi* producida desde la adición del suero inmune de rodaballo hasta las 6 h, donde se puede observar claramente la presencia de cápsulas vacías (flechas).

Cuando se observa el proceso de aglutinación con más detalle mediante SEM, los cambios superficiales que tienen lugar en el ciliado en presencia del suero inmune de rodaballo con el tiempo son notorios. Con respecto a los trofozoítos control, los que fueron incubados con el suero inmune presentan una clara alteración de los cilios, además de un aumento de su diámetro y la aparición de una capa de material amorfo en su superficie que incrementa en espesor con el tiempo. A medida que aumenta el tiempo de incubación estos cambios son más evidentes. A las 6 horas, las microfotografías muestran claramente la presencia de estructuras que mantienen la morfología externa del ciliado pero cuyo interior es hueco y al lado aparecen ciliados con su estructura completamente normal (Figura 3).

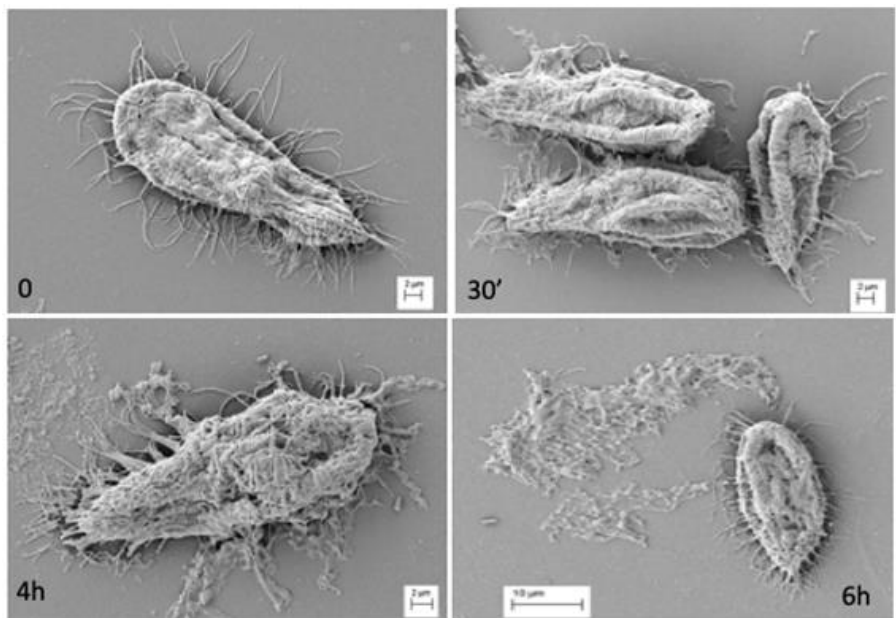


Fig. 3: Microfotografías al microscopio electrónico de barrido (SEM) de trofozoítos de *P. dicentrarchi* que muestran los cambios que los ciliados sufren en su superficie desde la adición del suero inmune de rodaballo hasta las 6 horas de incubación.

5.4.2. Caracterización molecular y bioquímica de proteínas asociadas a los extrusomas

A partir del análisis del genoma se encontraron las secuencias completas de ADN para los genes TMPT2A y TMPT4B, las cuales presentan varios intrones (Figura 4A y 4B).

A)

10	20	30	40	50	60
ATGAGAGTTC	TTACCGCATT	ATTTGCTTGC	GTTCTCGTCT	TGGGAGCCTT	CGCTGTTACC
70	80	90	100	110	120
GATCCTGAAA	TTGCTTCTGT	CGTTAGAAGT	AAACTTTTTT	TTGATTGAAC	CATCTCTTTA
130	140	150	160	170	180
AGAAAAAACC	GATATCAAAA	CTACAGAGTG	GCAAATCGTT	TTTACAAATT	ATACTACATT
190	200	210	220	230	240
ATATTATTTA	ACTCTATATT	TATCTAACCT	TATTCATTAT	GTTTATTATTA	GAGATGGAAA

```

250      260      270      280      290      300
ATTCCAAATA CGGAAAAACC TTATTAGACAA CTATTGCCCTT CTAAATGGAAA GCTGGAGACCC

310      320      330      340      350      360
CAGTAAAAAAA AAATATTATAA ATTTGATTTTT TTTTCAAACAA ATGGCGTGATT GAAAAAATAAA

370      380      390      400      410      420
AAAACGAATAA ATAAAAATCTT ATAAAAATTTT TTATAAGTAAA ATAAAAAAAA TAAAAATAAAA

430      440      450      460      470      480
ATAGAAAACCC ATCGCCAATTT TATTAAAAATA AATAGTCTTAA TATAATCAATT AGAATTATAAA

490      500      510      520      530      540
TATCAAATCAA TTTATATTTAA AATCTTAAATT CTAATTTAATT TTTCTTTCTTT TAGGTCCAAGG

550      560      570      580      590      600
ATTTGATTGAA CATGCTCCAAA GAAACTGAAGG ATGGATTAGAA AAGAGCCCCAA GACGAAGATGG

610      620      630      640      650      660
ATGAATTCATT CAGAAACGGTT AATCATAAATT AAATAAACAAA AAATATATACT TTAGACCAATT

670      680      690      700      710      720
AATTAAACAGG AATAAGAAAGG ATGTGATGTTT GACTTAGCTAA GATTGCAAGGG AGAAATCGAAA

730      740      750      760      770      780
GATGCCGCCAA GAAGAATCGCG TGAACCTCTAAA GCTGAATTAGG ATGAAAAAATT CCCCATTAGAA

790      800      810      820      830      840
GATGAAAAAGG TCAGAGTCTTT AGGAGAAAAAGG AATGAATGGAA AAGATCACTTT AGAAGCCAAAA

850      860      870      880      890      900
GTCGCCGAAAA TTGACTCTCAA AAAAGTCTTGG AAAGACCAAGG AATGGTAGCAA AAAACATTTTT

910      920      930      940      950      960
AATATACTACT AATAACTTAAA CTATCAAACAA TACAAACAATT CAATCAATAAA AAAATATACAA

970      980      990      1000      1010      1020
TATATATAAAA TTTAGCAATAA CTATTTTAAAA TCAATAAAATT AAATAGGGCCC GAAGAATAAGG

1030      1040      1050      1060      1070      1080
AATAACACGAA CTAAGCCCAAA TACGTCATCGG AAAAAGCCAAA AACCATCATCT GTTGAAGCTTT

1090      1100      1110      1120      1130      1140
TGAAAGCCAAA CTCCTTCTTGG TAAAAAGGAAA ACACCGCTTTT CGCCCAAGTCT TCATCCCACT

1150      1160      1170      1180      1190      1200
TCGCCAAACAA CTCCAAAACCC CACTTCAAAAA GATAATCTTGG GTCCAAAATCT TTCAATCTCTT

1210      1220      1230      1240      1250      1260
TATCTCAAATT CACCTCTTCCC GCCCCCGTCCC AAGCTGACCAA AGGATCCGTTT CAAAAAGTTAA

1270      1280      1290      1300      1310      1320
TCGACCTTTGG CGACTCTTTAA TTAGACAAAAA TCTCTGAATCT TAGAGAAATCT GAAAGAAGAGG

```

1330 1340 1350 1360 1370 1380
ACTACTAACA CTGGATGGAA GAATACAAA ACTTCAGAAA CCAATTACTT GATAAACTCG

1390 1400 1410 1420 1430 1440
TTCAAGTCAA CAAAGAAATC GCTGACTTAG AATAATAAAT TGCCGCCTTA AACAAAAGAA

1450 1460 1470 1480 1490 1500
TCGCTCAATG CCAAGCCGAA AAAGCTGACC AAGAAGAAAG ATTCAGATAA AAAACCTCAG

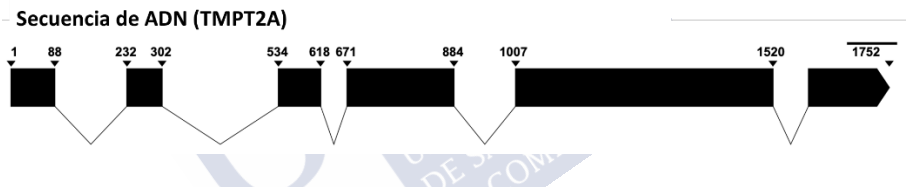
1510 1520 1530 1540 1550 1560
AACACGAAGA CTTATTATAA GTAATATTTT AAAACTAATT TTTTGATATA ATTTATTTAT

1570 1580 1590 1600 1610 1620
ATATTAAATA AATATATACA TTTACAACAG TACTGTGACG ATGCTAATGT TGCTTATGCT

1630 1640 1650 1660 1670 1680
AAAAGAAGAG AATCAAGAAA CGACGAAAGA GAAGTTGTAT CTGATGCCAT CGGACTTTTG

1690 1700 1710 1720 1730 1740
TAATCTAAAT TGAGAACTTT CAGATAATAT GTCAGTGAAA GAATGGGATC TGATGTCAAA

1750
AGAGCAGATT GA



B)

10 20 30 40 50 60
ATGAAAAGAG TGCGGATAAT TTTATTATTG ACAGTTTTGT CATAGTGTGG AATCTAAAGA

70 80 90 100 110 120
TCCCCTGCAA GACTATCAGA TACAAAAACT GTTTTGGCTG AAGTAAAAAA ATAAAAAATA

130 140 150 160 170 180
TTCATTAATA GAATGTTATC AAATCATGTA AAAAATTATA TTCATTTAGA TGGATAAAGA

190 200 210 220 230 240
TTCTTTTGGA TCAACAATCC TTTCCGCAGT TGCCTTAAAT GCTGCTACTG GAAATCCAGT

250 260 270 280 290 300
TGAAGAAATT ACAGTTTTAA TAGAAGAAAT CGTAGAGTAG TTAACAAC TG AATAAAACCA

310 320 330 340 350 360
AGCCGATGGA CTAAATACAT AAAATGAAGC TTGTAGATT AACTTAAAGT ATTTATTATT

370 380 390 400 410 420
ATATAGAAAT AAAATATTTT TAAAAAATA GCTTGCGAAA CCAATATTGA TAATTTGAAT

IRIA FOLGUEIRA LÓPEZ

```

      430      440      450      460      470      480
CAATAAATCG CACAAACCAAGCCACTATT GAATCAACAG AAAATGCTCT TAAGATAAAC

      490      500      510      520      530      540
TCTGAAATTT TAAAGGATGC CAAAGTTACT TTAGCTTAAG CTGTAAGCAA TTATATATTA

      550      560      570      580      590      600
AAATTCCTAA TTACAAATTC TTCCTATTCA GTTTTATTTA TAATATTTTT AACTATCTAA

      610      620      630      640      650      660
AGAACAGAGA TTTTGATGAA GTTGTTGAAT CAATTGATCA AGGTAAGTTG TGTGTAGTGT

      670      680      690      700      710      720
TATTAATAAA AAATGAAAAA TAAGTAAATT AAAATCTATT TTTAATTAAG GATCCTAGTA

      730      740      750      760      770      780
AAGAAGAGCT GACCACGAGA GATGGGTAGA GGAAGATTAT GCTAATGCCA TTTC AATTGC

      790      800      810      820      830      840
TACTTTAGAA GAAGGAGTCA AACTTATTAA CCACATGATT CGTAAATTCT AAAAAATTTA

      850      860      870      880      890      900
TAAGTTTTTA AAGCTGTATG TAGCTCGATT TTAATAATAT TATAATAATC TTGTTTAAAG

      910      920      930      940      950      960
ACGGAGTTGA ATTACACAA ATCAAATCTA GATACGAAAA GGTTTTAGAC AAACCTCAAAG

      970      980      990      1000      1010      1020
AAGACAACAA CAAACATGCT TCTCTCTTCA AACCTTTAAT TTCTTCTTTA ACTTAATTGG

      1030      1040      1050      1060      1070      1080
CCACCAGATT GAATTATGAA AATGTTATGA AAATCCTTGA ATTATTAAC AATATTAGAT

      1090      1100      1110      1120      1130      1140
TAACTATAGC TGAAGAATAA CAATAAGCTA AAGAAGCCGG TAAATTTTAT TATTATTGAT

      1150      1160      1170      1180      1190      1200
ATTTTTTTAG TTTATTAACT GTAAAAATCT TTAGAAAATA TCGCTAGTGA AGATTGGTAA

      1210      1220      1230      1240      1250      1260
AAATTATTAA ACCACTTAGC CGCTGAAAAA TAAAGATTGG GAGATAAAAA GGCCAGATTA

      1270      1280      1290      1300      1310      1320
AGTAGTTTAA TTGAAGCTAC CACCACCTTA CTCGAATAAT ATAGACAATC TTTGGAAAAAT

      1330      1340      1350      1360      1370      1380
AATAAAGTTT AATTAGAAAA CTATAGCCAG ACTCTCGTAA ATGAAACATA AAGATGTAGT

      1390      1400      1410      1420      1430      1440
CAATAAGCAG AAACCTATGC AGTTGAATCA GCTGAAGTAA TAGCAAAATT ATTGGTTTAT

      1450      1460      1470      1480      1490      1500
AATATGCATT CATAATTTTT ATATATTAAA ATCATTTAAT ATTATAGAGA GCTAGAGAAC

```

1510 1520 1530 1540 1550 1560
TAGAAATTTT AGAAAGATT CTTGAACACA TGAGAGAAAA ATATAATTAA GTTAGTGAAT

1570 1580 1590
ACGTTTCCAG CAGAGTTTAT TCCGATTCTCT GA



Fig. 4: Secuencias de ADN para los genes A) TMPT2A y B) TMPTB4. Debajo de cada secuencia se representa de manera esquemática la presencia de exones (negro) e intrones (blanco) a escala. La barra de la escala indica 100 nucleótidos.

Como se observa en las fotografías realizadas al microscopio electrónico, *P. dicentrarchi* presenta dos tipos de extrusomas asociados a la membrana plasmática, los cuales se encuentran inseridos entre los sacos alveolares. Se diferencian claramente tanto por su morfología, unos presentan morfología esférica y los otros morfología fusiforme, como por el tipo de material que contienen ya que uno es más electrodensito que otro (Figura 5A y 5B). A partir las secuencias del transcriptoma obtenidas mediante el estudio del RNA-seq se han localizado dos secuencias de proteínas que están relacionadas con los extrusomas del ciliado: 1) *P. dicentrarchi trichocyst matrix protein T2A* (TMPT2A) (GenBank número de acceso MH412657.1), codificada por un ARNm de 1134 pares de bases que genera una proteína de 377 aminoácidos, peso molecular de 43502.79 Daltons y punto isoelectrico teórico de 4,96. Esta proteína tiene un péptido señal entre la posición 1-18, con un punto de escisión entre la posición 18 y 19 correspondiente a la región C del péptido señal. La región N del péptido señal se encuentra en los aa 1-2. La proteína TMPT2A posee 12 sitios de O-glicosilación potenciales en los aa 182, 189, 195-196, 202, 210, 222, 223, 224, 317, 348 y 366 (Figura 5C y 5E). 2) *P. dicentrarchi trichocyst matrix protein T4B* (TMPT4B) (GenBank número de acceso MH412658.1), codificada por un ARNm de 1113 pares de bases que genera una proteína de 370 aa, peso molecular de 41996.11 Daltons y punto isoelectrico teórico de 4,90. Esta proteína tiene un péptido señal

entre la posición 1-16. La región C del péptido señal se encuentra entre los aa 13-16 y la región N entre los aa 1-3. La proteína TMPT4B posee 12 sitios de O-glicosilación potenciales en los aa 21, 28, 54, 104, 111, 147, 218, 286, 291, 292, 301 y 324 (Figura 5D y 5F).

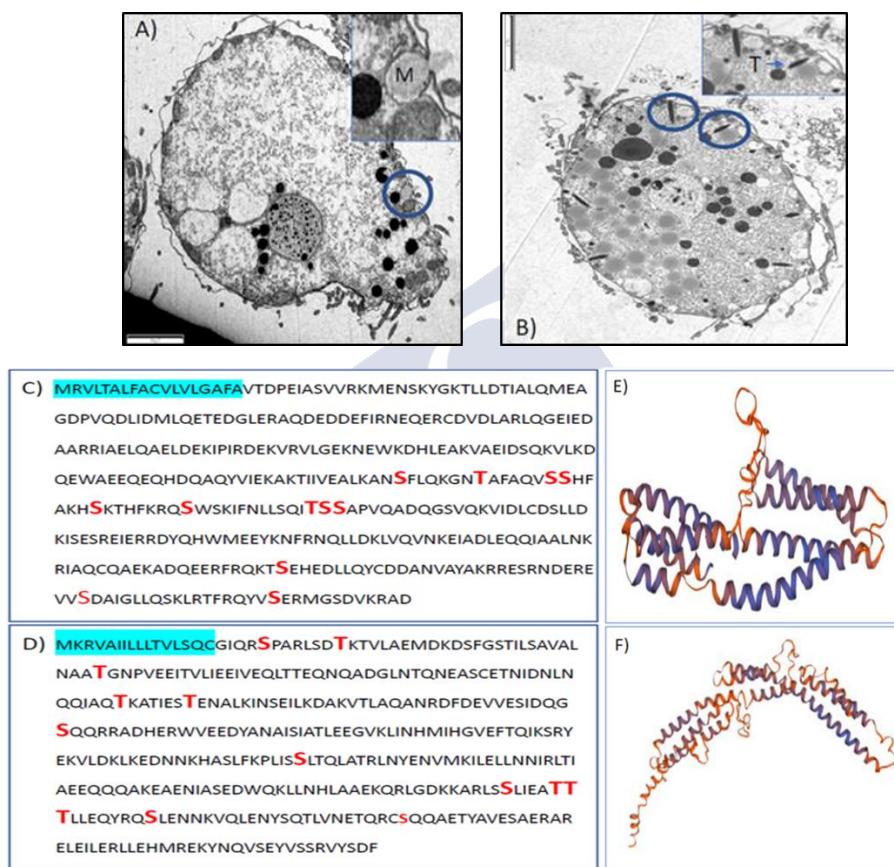


Fig. 5: (A, B) Microfotografía al microscopio electrónico de transmisión (TEM) de trofozoitos de *P. dicentrarchi* que muestran la estructura de los dos tipos básicos de extrusomas: A) extrusomas esféricos (círculo) de tipo mucocisto (M), y ampliación detallada de estas estructuras en la parte superior derecha de la imagen; (B) extrusomas fusiformes (círculo) del tipo tricocisto (T), y ampliación detallada de estas estructuras en la parte superior derecha de la imagen. C) Secuencia de nucleótidos (1134 pares de bases; 377 aa) que codifican para la proteína T2-A de la matriz de los tricocisto de *P. dicentrarchi* (TMPT2A). D) Secuencia de nucleótidos (1113 pares de bases; 370 aa) que codifica para la proteína T4-B de la matriz de los

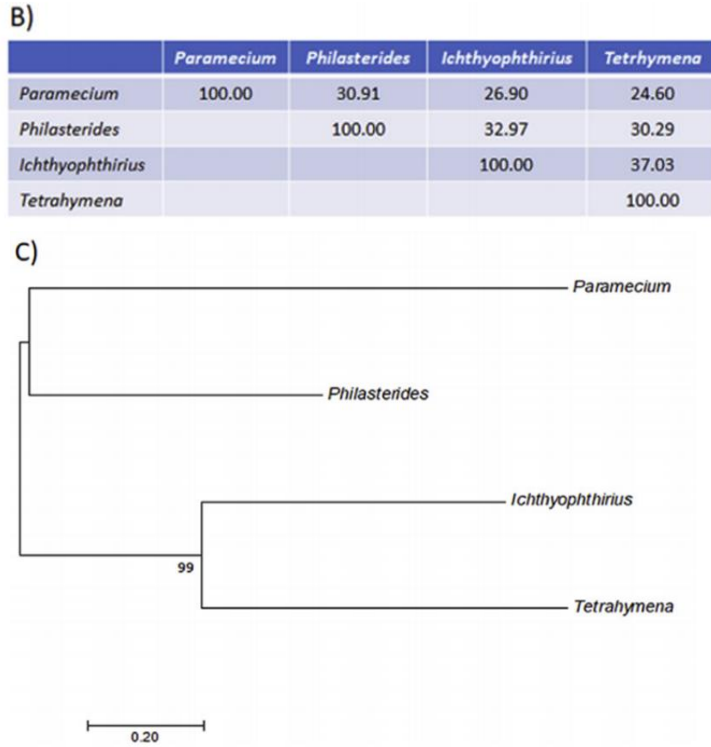


Fig. 6: A) Alineamiento de secuencias múltiples de la proteína T2-A de la matriz de los tricocistos de *P. dicentrarchi* y de cuatro ciliados representativos del filo Ciliophora mediante el programa CLUSTAL OMEGA (v.1.2.4). B) Matriz de identidad porcentual creada con la herramienta Clustal 2.1. C) Análisis filogenético molecular por el método de máxima verosimilitud. El árbol se dibuja a escala, con longitudes de rama medidas en el número de sustituciones por sitio. Para el análisis se utilizaron 4 secuencias de aminoácidos. Hubo un total de 367 posiciones en el conjunto de datos final (se eliminaron todas las posiciones que contienen huecos y ausencia de datos). Los análisis evolutivos se realizaron en el programa MEGA7.

Las proteínas TMPT2A y TMPT4B presentan un 23% de identidad al comparar sus secuencias nucleotídicas y el porcentaje de identidad sigue siendo bajo si comparamos la secuencia de aa de estas dos proteínas con las de otros ciliados (*Paramecium*, *Ichthyophthirius* y *Tetrahymena*), con identidades máximas que apenas superan el 30% para TMPT2A y TMPT4B (Figura 6A, 6B, 7A y 7B). Filogenéticamente, la proteína TMPT2A está más cerca de

Paramecium (Figura 6C), mientras que la proteína TMPT4B está filogenéticamente más separada con los otros ciliados analizados (Figura 7C).

A)

```

Paramecium      MARSLLTILAVFVAT--A-RVTKSESPKEILAQVVKDSFGNSILSVLQLQLATGGPVGE
Ichthyophthirius MKSIFLIALFATVI----FATLSNKEVHLQLSEIQKETFGQTHLAIQVWNSHNSPEL
Philasterides    MKRVAILLLTVLSQCGIQSPARLSDTKTVAEMDKDSFGSTILSAVALNAATGNPVEE
Tetrahymena       MNKLLFVVLITLAV-----VFATRETNVALAEMHRSFAFGTILSTIQLNLAAYDVPSP
                  *   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :
                  *   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :

Paramecium      IQILLNNIASQLNGDQKKADKHVESDTVAFEKIIADLEQEIAYHQTIQVLSNLRDSTTE
Ichthyophthirius IRALLEIHIQLAGDQEQADNRIEEVRSYRENLSLSHRTITQTNTITSLENSIKLNKV
Philasterides    ITVLIEEIVEQLTTEQWQADGUNTQNEASCETNIDNLNQIATQKATISSLENAKINSE
Tetrahymena       ITTLVDQILQSLQESQAADYRNSTNQVRCQNIQEQFSRQIKDTQNTISSLSQSQINHQDQ
                  *   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :
                  *   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :

Paramecium      ALGEAEVEVRVVTSDIANNEKSFADSATRQSQHDTWVKDAEHVDQHEAIDEASKIVQH
Ichthyophthirius SLDQAKTQLIAQSDYDNTVNSIDVGTKERAEANQKQESDAELTETLASVDEATKLIQH
Philasterides    ILKDAKVTLAGANRDFDEVESIDQGSQRRADHERHWEDYANAIATLEEGVKLTNH
Tetrahymena       SLQRDNYALQQASEDYDNTDISIDKGTVDREDAHERHWEQSKIEITLALNADQATKLIQH
                  *   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :
                  *   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :

Paramecium      LQAGVAFQKSRFEKVQAKLMESK---HALFKPLINALQLASKVONKSIITKILELLAQ
Ichthyophthirius MLNGVSFVQKSRFDKVFQKLNQSKQASLFRPLVMALQSISHLKLYNNQKILNLLNS
Philasterides    MIHGVFTQIKSRYSYKVLQKLEONNKHASLFKPLISSLTQLATRLNYENMKILELLNN
Tetrahymena       MVHGVSAQIKSRYSYKVLQKLEONNKHASLFKPLISSLTQLATRLNYENMKILELLNN
                  :   *   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :
                  :   *   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :

Paramecium      IRQQLVASRSLATEERQAMNIEVQSSHLSEHKRLVERKAFLENSIVQFVITIQEAVE
Ichthyophthirius LRQSLADVQNNKNNVEERQSKQWDEDLVLLQHKRYEQILEKNTLNGLESISRETL
Philasterides    IRLTIAEEQQQAKAEANIASQEDNQKLLNHLAAEKRLGDKKARLSLIEATTTLLQYRQ
Tetrahymena       LRQALTDQDEGRVAEETAQNLWQKLLLEQLNQKQYDQEKRLTDQIISALLNQKHN
                  :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :
                  :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :

Paramecium      DLEDQTLFLEDAEDSLAIQERMAAEQESQYEAQTFEREQQLVEVERQELVQTLKSAASE
Ichthyophthirius SLANNRLTLDLTLENEKAVKLQYNDEEHYTKFSTERERETDILEKNDYLVAVFGAVSE
Philasterides    SLENNKVLQENYSQTLVNETQRCSQAETAYAVESAERARELEILERLLHMRREKYNQVSE
Tetrahymena       SLENNNNISLNFIIQLQDEQTLQKQSLDYEDETKENQKESAILMELKEHNEKFSQVVE
                  :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :
                  :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :

Paramecium      FLQVREEVF-
Ichthyophthirius FLQIQ-----
Philasterides    YVSSRVYSDF
Tetrahymena       FIQ-----
                  :   :

```

B)

	<i>Paramecium</i>	<i>Ichthyophthirius</i>	<i>Philasterides</i>	<i>Tetrahymena</i>
<i>Paramecium</i>	100.00	28.65	31.68	30.23
<i>Ichthyophthirius</i>		100.00	36.11	36.97
<i>Philasterides</i>			100.00	40.06
<i>Tetrahymena</i>				100.00

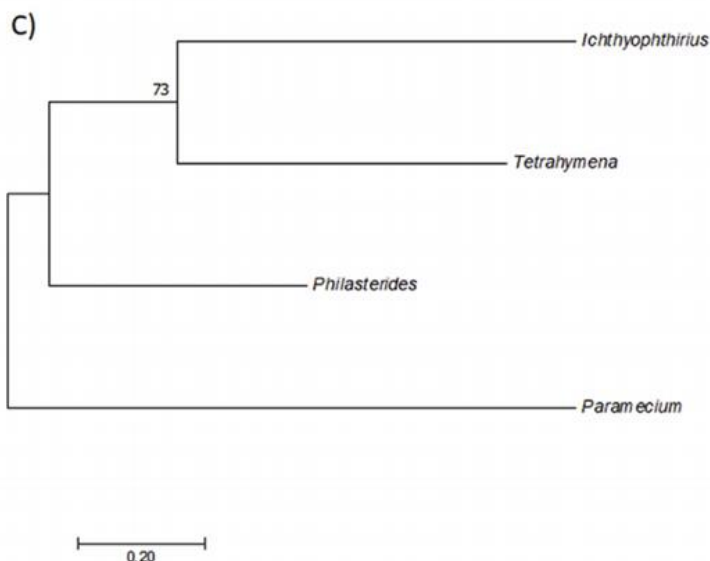


Fig. 7: Alineamiento de secuencias múltiples de la proteína T4-B de la matriz de los tricocistos de *P. dicentrarchi* y de cuatro ciliados representativos del filo Ciliophora mediante el programa OMEGA CLUSTAL (v.1.2.4). B) Matriz de identidad porcentual creada con la herramienta Clustal 2.1. C) Análisis filogenético molecular por el método de máxima verosimilitud. El árbol se dibuja a escala, con longitudes de rama medidas en el número de sustituciones por sitio. Para el análisis se utilizaron 4 secuencias de aminoácidos. Hubo un total de 354 posiciones en el conjunto de datos final (se eliminaron todas las posiciones que contienen huecos y ausencia de datos). Los análisis evolutivos se realizaron en el programa MEGA7.

Cuando los ciliados incubados con suero inmune de rodaballo se tiñen con el colorante Safranina O se observa un aumento progresivo, dependiente del tiempo de incubación, en la intensidad de la tinción tanto en el citoplasma como en el material externo que rodea al ciliado (Figura 8).

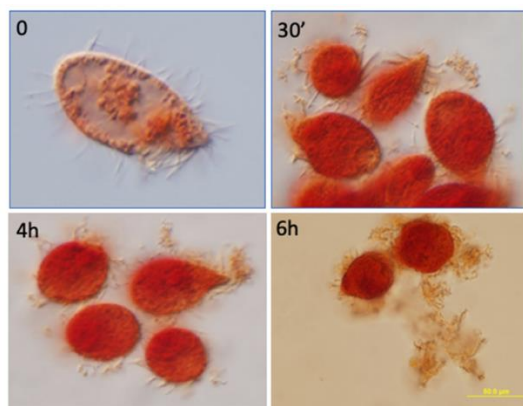
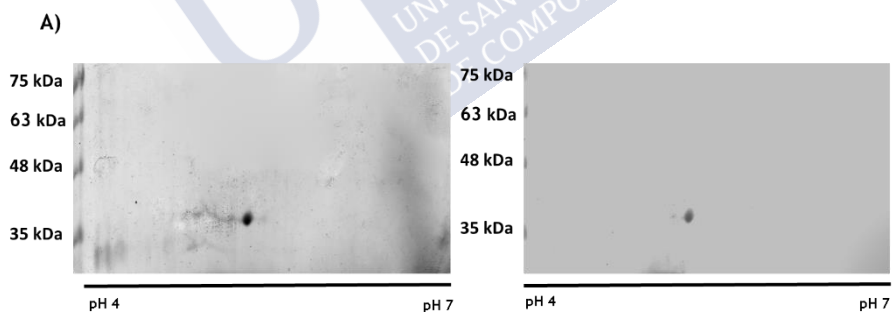


Fig. 8: Análisis histoquímico de la producción de mucina (componente peptidoglicano de los extrusomas) mediante tinción con safranina después de la incubación de trofozoítos de *P. dicentrarchi*: A) control; B) incubación durante 30 minutos con suero de rodaballo inmune; C) incubación durante 4 h con suero de rodaballo inmune; D) incubación durante 6 h con suero de rodaballo inmune.

5.4.3. Expresión y localización de las proteínas de los extrusomas después de la exposición al suero inmune de rodaballo

Con el fin de determinar si las proteínas asociadas a los tricocistos realmente están relacionadas con la formación de las cápsulas que se observan durante la aglutinación de los ciliados tras ser incubados con el suero inmune de rodaballo, se llevaron a cabo una serie de ensayos para los cuales era necesario disponer de la proteína recombinante. Para ello, se sintetizaron las proteínas r-TMPT2A y r-TMPT4 a partir de su expresión en levaduras, cuyo peso molecular y punto isoeléctrico (43 y 42 kDa; pH 5, respectivamente, se confirmaron mediante 2-DE (Figura 9A). Mediante la inmunización de ratones con estas proteínas se obtuvieron sueros con anticuerpos frente a las proteínas r-TMPT2A y r-TMPT4. Los resultados obtenidos a partir del FELISA realizado con el suero anti-r-TMPT2A muestran una relación entre el material que se produce después de la incubación con el suero inmune de rodaballo y la expresión de la proteína, ya que al aumentar el tiempo de incubación aumentan los niveles de absorbancia debidos a la inmunofluorescencia (Figura 9B). Esto mismo se confirma con el Western Blot, donde la intensidad de la banda marcada por los anticuerpos generados frente a las proteínas r-TMPT2A y r-TMPT4B aumenta a medida que se

incrementa el tiempo de incubación (Figura 9C). A partir del FELISA realizado con suero anti-proteasas también se observó un aumento en la producción de proteasas a las 6h de incubación con el suero inmune de rodaballo (Figura 9B). Esto se corresponde con el momento en el que se observa al microscopio como los ciliados son capaces de abandonar las cápsulas. El suero anti-r-TMPT2A también se utilizó para la citolocalización de las proteínas mediante la realización de un ensayo de inmunofluorescencia sobre los ciliados incubados a distintos tiempos con el suero inmune de rodaballo y su posterior visualización en un microscopio confocal. En este caso, los anticuerpos marcaban proteínas de manera localizada en orgánulos en la parte interna de la membrana plasmática de los trofozoítos control. Al incubar los parásitos con el suero inmune de rodaballo se observa un aumento en el marcaje en esta zona a los 30 minutos. A las 4 horas se observa marcaje por toda la superficie de los ciliados, los cuales se encuentran aglutinados, y por todo el medio extracelular. A las 6 horas el marcaje en el exterior celular y en la cubertura de los ciliados es menor y vuelve a apreciarse un ligero marcaje en puntos localizados en el interior de la membrana celular (Figura 9D).



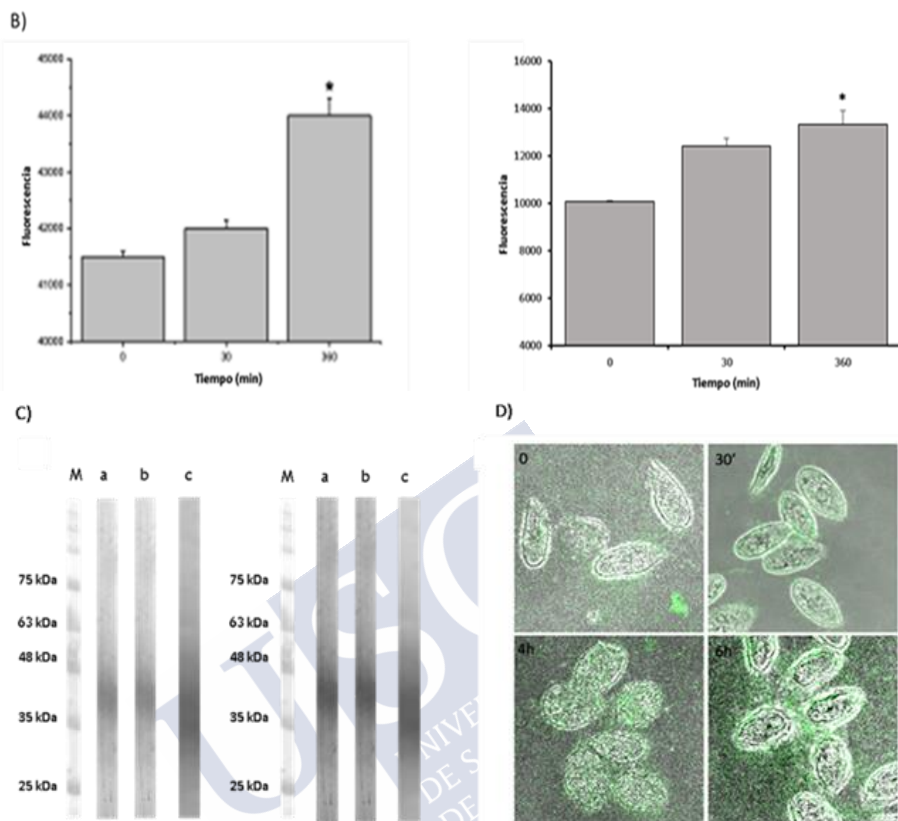


Fig. 9: (A) Análisis por 2-DE de las proteínas recombinantes de la matriz de los tricocistos de *P. dicentrarchi* r-TMPT2A (izquierda) y r-TMPT4B (derecha). M: marcadores de peso molecular en kDa. (B) Análisis FELISA de los niveles de TMPT2A (izquierda) y proteasas (derecha) expresados por los trofozoítos incubados con el suero inmune de rodaballo a 30 minutos y 6 horas de incubación. Los valores se muestran como media \pm desviación estándar. El asterisco indica una diferencia significativa ($P < 0.01$) con respecto al control (tiempo 0). (C) Western Blot con sueros anti-r-TMPT2A (izquierda) y anti-r-TMPT4B (derecha) frente a ciliados control (a), ciliados incubados con suero inmune de rodaballo durante 10 minutos (b) y ciliados incubados con suero inmune de rodaballo durante 6 horas (c). M: marcadores de peso molecular en kDa. (D) Microfotografías al microscopio confocal de trofozoítos de *P. dicentrarchi* incubados con suero inmune de rodaballo en diferentes momentos. Las imágenes corresponden a la combinación de una imagen visible y una inmunofluorescencia (señal verde) utilizando un anticuerpo anti-r-TMPT2A de ratón y revelado con un anticuerpo de conejo anti-ratón conjugado a FITC.

5.4.4. Expresión de genes asociados con los extrusomas y su relación con la descarga de Ca^{2+} intracelular después de la estimulación de los ciliados con suero inmune de rodaballo

Como se puede observar en la figura 10A, la incubación de los ciliados con el suero inmune de rodaballo dio lugar un aumento significativo en los niveles de ARNm de los genes que codifican para las proteínas de los extrusomas a medida que se aumenta el tiempo de incubación de los trofozoítos con el suero inmune de rodaballo. Para este ensayo se utilizaron como control positivo ciliados tratados con dibucaína. El aumento de la expresión, en términos de valores medios absolutos, fue mayor para el gen TMPT2A que para el gen TMPT4B.

Por último, se analizó el efecto del suero inmune de rodaballo en los niveles de Ca^{2+} intracelular gracias a la sonda Fluo-4NW. Como se puede ver en la figura 10B, la incubación con el suero inmune de rodaballo induce la producción de Ca^{2+} intracelular. Este aumento tiene una relación directamente proporcional al tiempo de incubación de los ciliados.

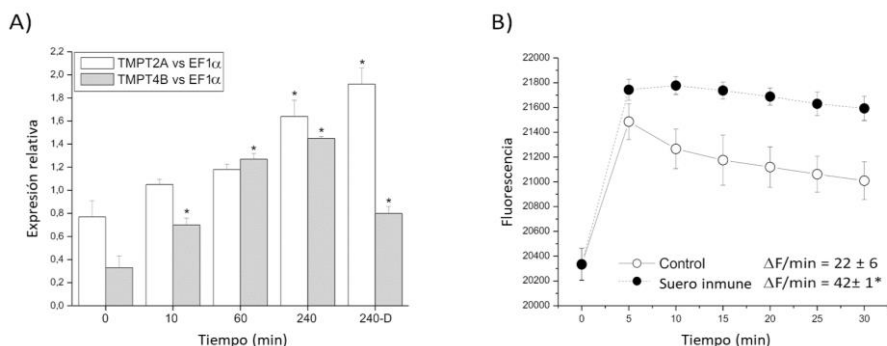


Fig. 10: A) Niveles de expresión de los genes que codifican para la proteína T2A de la matriz de los tricocistos de *P. dicentrarchi* (TMPT2A) y la proteína T4B de la matriz de los tricocistos de *P. dicentrarchi* (TMPT4B) en ciliados incubados diferentes tiempos con suero inmune de rodaballo y dibucaína (240-D). Los resultados se cuantificaron como la expresión génica relativa frente al factor de elongación 1-alfa (EF1 α) de *P. dicentrarchi*. B) Respuesta de calcio de trofozoítos estimulados con suero inmune de rodaballo (SIR) y solución salina balanceada de Hanks (HBSS sin Ca^{2+} , Mg^{2+} ni rojo fenol) cuantificada mediante el kit comercial Fluo-4 NW calcium assay

kit. Los valores se muestran como la media \pm desviación estándar para cinco replicas. Los asteriscos indican las diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.01$).

5.5. DISCUSIÓN

En los organismos protistas, los extrusoma son orgánulos exocíticos especializados capaces de descargar su contenido al exterior celular en respuesta a estímulos mecánicos o químicos externos como mecanismos de defensa o durante la depredación (adquisición de alimentos) (Buonanno y Ortenzi, 2016). En *P. dicentrarchi* se han descrito dos tipos de extrusoma: uno con morfología fusiforme (tricostis), situado perpendicularmente a la membrana plasmática, y otro con morfología esférica (mucocistos), con una distribución irregular (Dragesco et al., 1995; Paramá et al., 2006). Los mucocistos están situados debajo de la pared celular, en contacto directo con el citoplasma. Estos orgánulos están rodeados por una membrana, tienen un diámetro de aproximadamente 1 μ m y son capaces de fusionarse con la membrana plasmática, disponiéndose de manera perpendicular, y liberando su contenido al exterior, creándose así una capa mucilaginosa sobre la superficie del ciliado (Paramá et al., 2006). Mientras que para los ciliados que viven en libertad los extrusomas podrían estar involucrados en una respuesta protectora o defensiva a los cambios ambientales, para los parásitos como *P. dicentrarchi* los mucocistos parecen constituir un mecanismo de defensa contra el ataque del sistema inmunitario cuando está dentro del hospedador. Esta idea ya fue desarrollada por Iglesias et al., (2003b) al realizar estudios de aglutinación de ciliados con diferentes sueros inmunes de rodaballo y conejo. En esos ensayos se observó que, después de 2 h de incubación con los sueros inmunes, aparecían abundantes estructuras transparentes con forma de cápsula que mostraban la topografía de la superficie del ciliado e incluso ciliados moviéndose de manera rotativa dentro de estas cápsulas. Este hecho puso de manifiesto la capacidad de los ciliados de abandonar las cápsulas después de aproximadamente 4-5 horas de incubación. Dicho fenómeno indica que el parásito es, por un lado, capaz de generar una barrera física que lo protege (cápsula) como un primer mecanismo de defensa y, por otro lado, capaz de liberarse transcurrido un cierto tiempo por acción de las proteasas, como mecanismo de evasión. La formación de cápsulas es un fenómeno ya

descrito dentro de los ciliados en numerosos estudios. En ellos se utilizaron distintos compuestos que inducen la exocitosis mediada por extrusomas. En 1981, Collins y Wilhelm, describieron una variación en el patrón de bandas en gel SDS-PAGE a partir de ciliados expuestos a dibucaína. Otros dos compuestos que dan lugar a esta liberación de material son el azul alcán y el NaCl 0,15M (Tiedtke et al.; Hünseler., 1990). Además, se ha visto que estímulos físicoquímicos, como el shock osmótico o el shock térmico, parecen tener el mismo efecto (Hausmann, 1978; Buonanno et al., Ortenzi, 2015).

La presencia de las cápsulas durante la aglutinación de los trofozoítos de *P. dicentrarchi* confirma que los anticuerpos del suero inmune de rodaballo inducen la secreción de material por parte de los mucocistos. Este material mucilaginoso se deposita sobre la superficie de los trofozoítos formando una capa protectora, como un molde, con una topología externa idéntica a la de los ciliados y que los protege de la aglutinación. Este proceso se observa claramente en todos los análisis microscópicos realizados tanto a nivel de microscopía óptica como electrónica (SEM).

En otros ciliados, como *Paramecium*, las proteínas que contienen tricocistos se caracterizaron por una forma altamente restringida que refleja la organización cristalina de las proteínas que contienen y que derivan del proceso de una amplia familia de proteínas precursoras (codificadas por unos 100 genes coexpresados) que permiten el correcto ensamblaje del núcleo cristalino, necesario para la función del tricocisto (Shih y Nelson, 1991; Madeddu et al., 1995). La proteína de la matriz del tricocisto en *Paramecium* tiene tamaños de entre 15-20 kDa, algunos de ellos están glicosilados, tienen puntos isoelectricos entre 4.7 y 5.5 y parecen provenir de proteínas precursoras de un tamaño entre 40-45 kDa. (Adoutte et al., 1984; Gautier et al., 1994).

En nuestro estudio, las proteínas TMPT2A y TMPT4B tienen tamaños de aproximadamente 43 y 42 kDa, respectivamente y puntos isoelectricos cerca de 5.0; es decir, compatibles con las proteínas precursoras descritas en *Paramecium*. Además, estas proteínas en *P. dicentrarchi* poseen secuencias con una identidad muy baja entre ellos,

aunque con puntos isoelectricos y tamaños muy similares. Esto parece indicar que la matriz de los tricocistos está compuesta por proteínas complejas interrelacionadas o por proteínas secretoras que sufrieron un proceso proteolítico durante su maduración (Adoutte et al., 1984) o modificaciones postraduccionales (Tindall et al., 1989). En *Paramecium tetraurelia* se ha demostrado que las proteínas liberadas por la exocitosis de los tricocistos son glicoproteínas (Glas-Albrecht et al., 1990) y, en varias especies, se ha descrito que el material que formar las cápsulas está constituido por mucopolisacáridos. (Maihle y Satir, 1986; Wolfe, 1988). *Tetrahymena* tiene extrusomas de tipo mucocistos que se caracterizan por contener proteínas ácidas similares a la mucina que pueden tener tamaños entre 40 y 80 kDa y que se pueden agregar y unir a Ca^{2+} (Sauer y Kelly, 1995). La O-glicosilación, también denominada O-glicosilación tipo mucina, indica que estas proteínas son las que transportan este tipo de glicanos a los grupos hidroxilo de los residuos de serina y treonina (Corfield y Berry, 2015). La tinción con Safranina O generalmente se ha utilizado para la detección de glicosaminoglicanos (Qin et al., 2018) y mucinas (Tas, 1977). Todas las mucinas están altamente O-glicosiladas y, tanto su biosíntesis como su degradación, están perfectamente integradas para mantener la protección de la célula contra las agresiones externas (Corfield, 2015). En este estudio, se observa claramente que la presencia de anticuerpos en el suero inmune de rodaballo actúa como un estímulo que causa la producción de proteínas similares a la mucina, como lo demuestra la tinción con Safranina O. Esta estimulación también causa un aumento significativo en la expresión de las proteínas de la matriz y la expresión de los genes que las codifican, lo que se demuestra mediante ensayos inmunológicos mediante los cuales se confirma que los componentes de la cápsula comparten epítomos con las glicoproteínas de la matriz de los extrusomas.

En los sistemas de secreción en ciliados, el Ca^{2+} es necesario para el acoplamiento del sistema estímulo-secreción (Gilligan y Satir, 1983). En *Paramecium* se ha demostrado que la liberación exocítica del producto secretor paracristalino derivado de la matriz de tricocistos es dependiente de Ca^{2+} (Garofalo y Satir, 1984; Satir, 1989). La aplicación

de ionóforos de Ca^{2+} , mediante la microinyección directa de Ca^{2+} en los ciliados, induce la exocitosis de tricocitos (Kerboeuf y Cohen, 1996). Por otro lado, en individuos del género *Tetrahymena*, la adición de dibucaína induce la secreción por parte de los mucoscistos produciéndose un aumento en el Ca^{2+} intracelular y en la liberación de mucina floculante (Tiedke et al., 1988; Sauer y Kelly, 1995). En este trabajo se demuestra que la presencia de anticuerpos en el suero de rodaballo induce una descarga intracelular de Ca^{2+} , lo que confirma que este estímulo activa el proceso de extrusión en trofozoítos de *P. dicentrarchi*.

Por lo tanto, *Philasterides dicentrarchi* es capaz de superar la aglutinación provocada por los anticuerpos específicos producidos por el hospedador a través de la formación de cápsulas generadas a partir de los extrusomas, gracias a la secreción de proteínas de matriz O-glicosiladas que poseen características similares a las de la mucina y cuya liberación genera un aumento en los niveles de Ca^{2+} intracelular. Todos los datos muestran que el ciliado utiliza la exocitosis como mecanismo de defensa y, probablemente, también para evadir la respuesta inmunitaria del hospedador. La tecnología de producción de las proteínas de matriz de los extrusomas en levadura, que tiene la ventaja de producir proteínas glicosiladas, nos permitirá desarrollar en el futuro proteínas recombinantes que podrían usarse en vacunas para la inmunoprofilaxis de la escuticociliatosis en el rodaballo. Otra posible aplicación de los resultados obtenidos a partir de estos estudios es la utilización de fármacos que inhiban el Ca^{2+} intracelular y que, por lo tanto, impidan que los parásitos puedan protegerse mediante la liberación de material al exterior celular.

Capítulo 6

BÚSQUEDA DE ANTÍGENOS Y CARACTERIZACIÓN PRELIMINAR DE LA FAMILIA DE LAS VSPs

6.1. RESUMEN

Los antígenos de superficie han sido descritos en numerosas especies de ciliados. Muchos protozoos han presentado una variación antigénica entre distintas cepas de una misma especie o bajo diferentes condiciones. Se ha visto, mediante ensayos de inmunización en peces, que estos antígenos pueden generar protección frente a distintos parásitos. Con el fin de buscar antígenos que puedan ser usados en una vacuna se han llevado a cabo técnicas inmunológicas y moleculares para analizar la posible variación antigénica entre cepas de *Philasterides dicentrarchi* que presentan distinta virulencia y entre ciliados de la cepa I1 bajo diferentes condiciones de cultivo. Como resultado, se vio que *P. dicentrarchi* posee distintas proteínas de la familia de las leishmanolisinas y de las proteínas variables de superficie (VSPs), las cuales se modulan en función de si el ciliado proviene de una infección o si permanece un largo periodo de tiempo en cultivo. También se han visto diferencias en la expresión de estos antígenos entre cepas, lo que sugiere que los trofozoitos utilizan la variación antigénica como mecanismo de evasión para sobrevivir dentro del hospedador. A la vista de los resultados, se han propuesto ensayos de vacunación usando estos antígenos con el fin de obtener protección en rodaballo frente a *P. dicentrarchi*.

6.2. INTRODUCCIÓN

Los antígenos de superficie son proteínas externas ancladas en la membrana plasmática o en la parte externa de la célula y están presentes en una gran variedad de organismos, incluidos bacterias, protistas y metazoos. La mayoría de los antígenos de superficie muestran una gran

variabilidad y pueden tener diferentes orígenes (Deitsch et al., 2009; Serradell et al., 2016). Esto puede deberse al polimorfismo alélico de los genes que codifican las proteínas de superficie, como se observó entre diferentes cepas de especies de *Plasmodium*, *Paramecium* y *Tetrahymena*, o a reordenamientos del ADN e intercambio en genes que codifican para proteínas antigénicas, lo cual parece estar relacionado con una evolución rápida del genoma mediante la creación y/o la eliminación de genes (Caron y Meyer, 1989). También se ha observado cierta variabilidad dentro de una única cepa o genotipo, lo que se corresponde con cambios en la expresión de varios genes alternativos que codifican proteínas similares. Esta función puede ser irreversible y estar vinculada a la diferenciación celular, o reversible, generalmente en organismos unicelulares, en cuyo caso se denomina variación antigénica (Smith, 1992).

Cada uno de los antígenos está codificado por un gen diferente presente en una copia por genoma haploide. Estos genes determinan tanto la capacidad de expresar un antígeno dado como la especificidad antigénica de la proteína. Además, las condiciones ambientales en las que un antígeno dado puede expresarse de manera estable vienen también dadas por su gen o el conjunto de genes para ese antígeno presente en la célula. Varios factores influyen en la expresión del antígeno, como la temperatura, el pH y la fuerza iónica del medio, la cantidad de alimento, etc. Algunos antígenos pueden inducirse fácilmente en todas las células de un cultivo en condiciones definidas; por ejemplo, en el caso de *Paramecium tetraurelia*, cultivar la cepa 51 por encima de 34 °C siempre da como resultado la expresión del serotipo A (Caron y Meyer, 1989). Otros son más difíciles de inducir específicamente porque varios antígenos pueden expresarse de forma estable en las condiciones óptimas para su expresión. Por lo tanto, parece razonable suponer que un conjunto dado de condiciones determina una cierta probabilidad de expresión de cada antígeno (Sommerville, 1970).

La superficie externa de los ciliados contiene proteínas variables conocidas como antígenos de inmovilización (i-antígenos), las cuales son capaces de cambiar o modular para adaptarse a diferentes

condiciones o defenderse de la respuesta inmunitaria del hospedador, llegando a estar asociados con la virulencia (Swennes et al., 2006; Xu et al., 2009). Los i-antígenos son proteínas de superficie identificadas originalmente en parásitos del género *Paramecium* y *Tetrahymena*, donde se expresan diferencialmente en respuesta a diferentes estímulos ambientales (Smith, 1992). Estructuralmente, los i-antígenos presentan una modificación de glicosilfosfatidilinositol en su extremo C-terminal, que los ancla a la membrana del parásito (Capdeville et al., 1978; Ko y Thompson, 1992). Los i-antígenos han sido ampliamente estudiados en *Ichthyophthirius multifiliis*, donde se ha visto que estos antígenos generan altos niveles de anticuerpos, dando lugar a sueros aglutinadores que inmovilizan a los parásitos en ensayos *in vitro* (Hatanaka et al., 2007; 2008). Los i-antígenos también han sido identificados en *Cryptocaryon irritans* (Priya, 2012; Mo et al., 2019).

Estos antígenos pueden ser diferentes entre cepas de la misma especie, ya que se ha visto reactividad cruzada, mediante ensayos de Western Blot, entre sueros generados frente a distintos serotipos de *I. multifiliis*. Esto indica que los i-antígenos comparten epitopos (Dickerson y Clark., 1993; Clark et al., 1995) y, a partir de ensayos de inmunización, se ha sugerido que estos epitopos son esenciales para el desarrollo de la inmunidad protectora (Clark et al., 1996; Lin et al., 1996). Sin embargo, las proteínas que conforman los i-antígenos en *I. multifiliis*, varían en tamaño y, dependiendo del serotipo, pueden estar formadas por uno o dos péptidos cuyo peso molecular oscila entre los 40 y los 60 kDa (Clark et al., 1995). A pesar de identificar el gen que codifica para el i-antígeno de 48 kDa en el serotipo A, lo que ofrecía información útil sobre la estructura general de estas proteínas, poco se sabía sobre las características que distinguían a los i-antígenos de los distintos serotipos hasta que se llevó a cabo la caracterización de dos genes que codifican para dos i-antígenos (de 52 y 55 kDa, respectivamente) en el serotipo D; lo que permitió comparar por primera vez i-antígenos entre serotipos de *I. multifiliis* (Dickerson y Clark, 1993). En 2014, Dickerson y Findly (2014), confirmaron mediante ensayos de protección cruzada que la eficacia de estos antígenos era específica del serotipo. Hasta la actualidad, se han

descrito un total de 17 i-antígenos localizados en la membrana de *Ichthyophthirius multifiliis*, identificados en al menos a 5 serotipos distintos, resultando ser diferentes entre ellos (Dickerson et al., 1993; Wang et al., 2019).

En las últimas décadas, el estudio de la variación antigénica se ha llevado a cabo en protistas, llegando a describirse en parásitos de vida libre, aunque la función de los antígenos variables de superficie en estos microorganismos es poco conocida. Algunos autores han sugerido que la variación antigénica puede estar regulada por alteraciones ambientales (cambios de temperatura regulan la expresión de antígenos de superficie) o que los protozoos son capaces de modular la expresión de estos antígenos para evadirse de depredadores o del sistema inmunitario del hospedador (Bannon et al., 1986; Simon y Schmidt, 2007). Dos géneros en los que se ha descrito ampliamente la variación antigénica son *Paramecium* y *Tetrahymena*. Si comparamos sus antígenos vemos que no muestran grandes diferencias, salvo por el tamaño. Los antígenos de superficie de *Paramecium* exhiben un alto peso molecular, entre 250 y 300 kDa (Hansma y Kung 1975; Forney et al., 1983). *Tetrahymena* presenta antígenos mucho más pequeños, cuyos pesos moleculares van desde 25 a 59 kDa (Ron et al., 1992; Gerber et al., 2002).

La variación antigénica en microorganismos implica tres características esenciales: una gran familia de genes homólogos que codifican antígenos de superficie inmunodominantes; un mecanismo que permite la expresión de un solo miembro de dicha familia en células individuales y un sistema molecular para la expresión reversible que determine el cambio en la expresión de un antígeno por otro. Por lo tanto, la variación antigénica se caracteriza por un cambio continuo en la expresión de los miembros de una familia homóloga de genes que codifican antígenos de superficie (Deitsch et al., 2009; Serradell et al., 2016).

6.2.1. Proteínas variables de superficie (VSPs)

En 1986, Nash y Aggarwal, con el desarrollo de anticuerpos monoclonales que reconocían específicamente la superficie de algunas células, demostraron que existen variantes antigénicas superficiales en el parásito *Giardia lamblia*. Además, al incubar los trofozoítos con un anticuerpo monoclonal generado frente a una proteína variable de superficie (VSP), vieron que el suero provocaba la aglutinación o la muerte de algunos protozoos; sin embargo, aquellos individuos que habían modificado su VSP, y que por lo tanto no eran reconocidos por el anticuerpo monoclonal específico, desarrollaron una nueva población de parásitos, los cuales expresaron diferentes antígenos de superficie. Más tarde se vio que también se daba una variación antigénica en los protozoos cuando se llevaba a cabo la infección de humanos o animales de experimentación con estos parásitos (Müller y Gottstein, 1998).

En el género *Giardia*, las VSPs se localizan en la densa capa molecular que envuelve la membrana de los trofozoítos, cubriendo toda la superficie del protozoo (incluido el disco ventral y los flagelos) como una capa compacta que proporciona una interfaz densa entre el parásito y el hospedador, protegiendo así a los ciliados de las condiciones del medio (Pimenta et al., 1991; Morrison et al., 2007). En las últimas décadas se han ido conociendo distintas VSPs dentro del género *Giardia* pero en 2007, una vez que se obtuvo el genoma completo, se pudo llevar a cabo una caracterización completa de estas proteínas. Las VSPs descritas en este género varían en secuencia y tamaño (sus masas moleculares varían entre 20 y 200 kDa), aunque todas son ricas en cisteína (alrededor del 12%). A diferencia de las proteínas de superficie asociadas con la evasión inmunitaria en otros parásitos, los genes que codifican para las VSPs en *Giardia* se distribuyen en ubicaciones no contiguas en todos los cromosomas, activándose o inactivándose sin evidencia de reordenamiento asociado o alteración de la secuencia. Se cree que en *Giardia* existen entre 235 y 275 genes que codifican para alguna VSP. Las distancias intergénicas entre los miembros de un grupo pueden ser muy cortas, llegando a superponerse el extremo 5' de una VSP al extremo 3' de otra (Nash y Mowatt, 1992; Morrison et al., 2007). En el análisis bioinformático, todas las VSP muestran un péptido señal

hidrofóbico. Además, cada VSP contiene un dominio altamente variable en el extremo N-terminal, que muestra frecuentes motivos CXXC (donde C es cisteína y X es cualquier otro aminoácido). Estos motivos CXXC también se han encontrado en proteínas de superficie de otros organismos, estén o no involucradas en la variación antigénica. Estos motivos contienen la mayoría de las cisteínas presentes en las VSPs y se ha sugerido que proporcionan propiedades estructurales a las proteínas, así como que confieran estabilidad redox a la superficie del parásito. La porción extracelular de las VSPs presenta una disminución progresiva en la conservación de los motivos CXXC, generando un alto grado de divergencia entre diferentes VSPs (Gillin et al., 1990; Adam, 2001). El extremo C-terminal de las VSPs presenta un alto grado de homología, con 38 aminoácidos que tienen casi el 90% de identidad. Esta región incluye un dominio transmembrana de 23 a 25 aminoácidos hidrófobos. El dominio extracelular de las VSPs constituye la interfaz hospedador-parásito, siendo las VSPs de *Giardia* proteínas integrales de membrana de tipo 1 (Prucca y Lujan, 2009).

Las VSPs de *Giardia* son resistentes a los efectos de las proteasas intestinales, por ello es probable que la función de esta familia de proteínas sea permitir que los trofozoitos sobrevivan en el intestino delgado de los organismos que parasitan. Sin embargo, algunos autores han sugerido que otra función de las VSPs, posiblemente extrapolable a otros patógenos, está basada en un mecanismo de evasión frente al sistema inmunitario del hospedador. En 2002, Carranza et al., vieron que se producía una variación en la expresión de la VSP dependiendo de la fase del ciclo de vida del parásito. En 2014, Emery et al., analizaron la expresión de varias VSPs en dos cepas de *Giardia intestinalis* y vieron que 26 de ellas se expresaban en la cepa que era virulenta, mientras que en la cepa no virulenta se expresaron solamente 3; relacionando así la presencia de VSPs y la variación antigénica con la virulencia.

La familia de las proteínas variables de superficie (VSPs) ha sido descrita en distintos organismos y se ha podido comprobar su función como sistema de variación antigénica, el cual podría intervenir en la patogenicidad, la adaptación al hospedador, la evasión del sistema

inmune y la virulencia (Behrens et al., 1994; Nash et al., 2002; Serradell et al., 2016).

En *Giardia lamblia* la VSP más caracterizada es el la VSPH7, una proteína de 56 kDa altamente inmunogénica (López-Romero et al., 2015), aunque también se han caracterizado otras como la VSP 5G8, de 71 kDa, la cual fue localizada en la superficie celular, llegando a generar altos porcentajes de aglutinación (Quintero et al., 2013).

Se ha visto que las variaciones antigénicas en *Giardia* están controladas por ARN interferente. (ARNi). La interrupción de esta vía generó trofozoitos capaces de expresar a la vez varias VSPs. Cuando se realizaron vacunaciones con trofozoitos capaces de expresar varias VSPs se alcanzaron mayores niveles de protección, lo que sugiere que la variación antigénica es esencial para la evasión inmune (López-Romero et al., 2015).

6.2.2. Leishmanolisinas

Las proteasas o peptidasas son enzimas que rompen los enlaces peptídicos de las proteínas, para lo que utilizan una molécula de agua, por lo que se clasifican como hidrolasas. Esta capacidad lítica está asociada a procesos de regulación y metabolismo, pero las péptidasas también cursan en procesos de evasión o defensa. Muchos protozoos tienen una o más etapas intracelulares durante su ciclo de vida. Para poder parasitar al hospedador, estos microorganismos han desarrollado sofisticados mecanismos de invasión, los cuales están regulados, en parte, por proteasas. Este tipo de enzimas pueden ser secretadas o bien estar asociadas a la membrana de los protozoos (Klemba y Goldberg, 2002).

Como se ha visto en diferentes estudios realizados en individuos del género *Plasmodium* y del género *Trypanosoma*, la incubación previa de los protozoos con inhibidores de proteasas redujo la capacidad parasitica. Por lo tanto, las peptidasas están relacionadas con el proceso de invasión y supervivencia por parte de los parásitos gracias al papel que estas juegan en la degradación de las células y tejidos del hospedador (Klemba y Goldberg, 2002). En *Philasterides dicentrarchi*

se ha visto que las peptidasas secretadas pueden degradar el colágeno tipo I, modular respuestas del sistema inmune celular e inducir la apoptosis de los leucocitos (Paramá et al, 2007a; 2007b), además de modular las respuestas inmunes humorales mediante la degradación de inmunoglobulinas y la inhibición de la actividad del complemento del hospedador (Piazzon et al., 2011b).

La leishmanolisina es la principal glicoproteína de superficie de la especie *Leishmania major*. Se trata de una metaloproteasa de zinc de 63 kDa, unida a la membrana y expresada en la superficie de los promastigotes (forma infecciosa de este parásito). Consta de tres dominios, dos de los cuales contribuyen a la formación del sitio activo, donde el ión zinc (II) está ligado a tres cadenas laterales de histidina. Para estudiar el papel de la leishmanolisina en la patogénesis y la virulencia de *Leishmania major*, Joshi et al. (2002) utilizaron mutantes deficientes en leishmanolisina y observaron que estos fueron más sensibles a la actividad del complemento del hospedador, por lo que concluyeron que las leishmanolisinas son un factor de virulencia vital en la patogénesis de *Leishmania*. (Joshi et al., 1998; Klemba y Goldberg, 2002).

Mediante estudios genéticos, se han comparado los niveles de expresión de diferentes peptidasas en ciliados bajo diversas condiciones de cultivo. Gracias al uso de librerías de EST (expressed sequence tag) se han analizado las diferencias en la expresión de genes asociados a las leishmanolisinas en dos fases distintas del ciclo de vida del parásito ciliado *Ichthyophthirius multifiliis* (la forma de vida libre, teronte, y la forma parasitaria, trofante). Utilizando esta misma técnica también se observaron diferencias en la expresión de genes de la familia de las leishmanolisinas, en este caso al analizar ciliados de la especie *Anophryoides haemophila*, en diferentes condiciones de cultivo. Estos resultados sugirieron que las leishmanolisinas juegan un importante papel en los ciliados a la hora de parasitar al hospedador (Cassidy-Hanley et al., 2011; Acorn et al., 2011).

Se estudió la expresión diferencial de genes en dos tipos de cultivos de *Miamiensis avidus* gracias al uso de librerías de ADNc, y se observó

una sobreexpresión de tres genes de la familia de las leishmanolisinas en ciliados obtenidos de una infección en comparación con ciliados que pasaron un largo periodo de tiempo en cultivo y sin comida. Esto sugiere que este tipo de cistein-peptidasas están relacionadas con la patogenicidad del parásito (Seo et al., 2013). Por lo tanto, las peptidasas están involucradas en el proceso de transformación de los ciliados de la forma de vida libre a la forma infecciosa invasiva. Un aumento en la expresión de leishmanolisinas en la fase invasiva del ciclo de vida de individuos del género *Leishmania* sugiere que estas proteasas juegan un papel importante en las primeras etapas de infección del hospedador. Se ha visto que las leishmanolisinas de este estadio parasitario son capaces de unirse al receptor de macrófagos, impidiendo la activación del complemento, y contribuyendo a la supervivencia intracelular (Klemba y Goldberg, 2002).

Por ello, las peptidasas se han estudiado activamente como candidatas para el diseño de vacunas o como dianas farmacológicas para la prevención y tratamiento de enfermedades parasitarias en distintas especies. Se han descrito inhibidores de cistein-peptidasas, los cuales han sido sugeridos como compuestos de quimioterapia antiparasitaria ya que resultan inocuos para el hospedador (McKerrow et al., 2008; Atkinson et al., 2009; Mayo et al., 2016). Sin embargo, en los últimos años ha cobrado fuerza el diseño de vacunas para peces a partir de péptidos quiméricos que permitan agrupar en un solo antígeno distintas proteínas, incluida la familia de las leishmanolisinas (Lokanathan et al., 2016); si bien, todavía no se han realizado estudios de protección en peces inmunizados con estos antígenos frente a parásitos.

Por lo tanto, los antígenos de superficie son los principales antígenos objetivo para el desarrollo de vacunas debido a que al ser la parte del patógeno que está más en contacto con el hospedador se presupone más antigénica (Leid et al., 1987; Kedzierski et al., 2004, Mello et al., 2004; Fankhauser et al., 2007). A la hora de diseñar una vacuna que genere una buena respuesta y que proteja frente a distintas cepas de la misma especie, es importante conocer y caracterizar estas proteínas. Con este fin, muchos autores han recurrido a diferentes

técnicas, tanto a nivel inmunológico como molecular. Las técnicas que utilizan la interacción antígeno-anticuerpo permiten purificar todas aquellas proteínas que han resultado antigénicas y que, por lo tanto, han dado lugar a anticuerpos, a los cuales son afines. El procedimiento más utilizado son las cromatografías de inmuoafinidad (IAC, *Immunoaffinity chromatography*), las cuales consisten en el paso de una mezcla compleja de proteínas sobre el inmuoabsorbente, donde el anticuerpo captura la proteína de interés debido a su especificidad, mientras que las otras proteínas se eliminan mediante el lavado de la columna. En estos casos, es preferible usar anticuerpos de baja afinidad, como los fragmentos de anticuerpos (fragmentos Fab mono y bivalentes), para que la separación del antígeno del anticuerpo sea más sencilla (Subramanian, 2002; Engström et al., 2005; Sheng y Kong, 2012). En todas las especies en las que se han descrito i-antígenos, se han utilizado anticuerpos monoclonales frente a estos antígenos para poder purificarlos mediante IAC (Wang y Dickerson, 2002; Xu et al., 2009; Wang et al., 2019)

Como se ha comentado anteriormente, existen diferencias antigénicas entre cepas o bajo distintas condiciones. En este sentido resulta interesante comparar genes que se expresen de manera diferencial ya que podrían estar relacionados con la antigenicidad. Una de estas técnicas es la hibridación sustractiva, la cual permite el aislamiento de genes que se expresan de forma diferencial en dos muestras distintas sin conocimiento previo de sus secuencias (Miao et al., 2006; Feng et al., 2007). Con el fin de encontrar diferencias en genes asociados a proteínas de superficie se han llevado a cabo en los últimos años ensayos de hibridación sustractiva para ver diferencias entre ciliados en distinta fase parasitaria. Uno de ellos, fue el llevado a cabo por Lee en 2011. En este estudio se buscó identificar un conjunto de genes involucrados en la fase parasitaria del escuticociliado *Miamiensis avidus*. Para ello, clones obtenidos mediante hibridación sustractiva a partir de ADNc de ciliados procedentes de cultivo y ADNc de ciliados procedentes de una infección fueron secuenciados. Los genes correspondientes a las secuencias obtenidas están involucrados en diferentes funciones celulares (proliferación y migración celular,

apoptosis, inflamación, infectividad y virulencia), además de un gen asociado a una proteína variable de superficie.

En los últimos años, las técnicas de secuenciación masiva han sido utilizadas para analizar tanto la expresión de genes entre poblaciones o de una población en diferentes condiciones, como para conocer el transcriptoma completo de una determinada especie. En 2013, Xiong et al., publicaron los datos obtenidos a partir de un RNA-seq llevado a cabo en *Tetrahymena thermophila*, lo que permitió obtener información relevante para el estudio de otros ciliados con los que comparte una gran cantidad de genes. Otra de las grandes aplicaciones de esta metodología es la búsqueda de disconformidades en los patrones de expresión génica entre poblaciones. De este modo se pueden encontrar discrepancias entre cepas de una misma especie, las cuales pueden presentar diferencias a nivel de virulencia o resistencia a distintas condiciones adversas, mediante el análisis comparativo de genes (Wolf, 2010; Westermann et al., 2012).

Hasta el momento se han llevado a cabo una gran cantidad de ensayos de vacunación basados en el uso de antígenos de superficie de parásitos, obteniendo diferentes resultados en cuanto al grado de protección. Algunos autores utilizaron para la inmunización antígenos de superficie purificados. En 2002, Wang y Dickerson, vacunaron ejemplares de pez gato (*Ictalurus punctatus*) con i-antígenos de superficie de *Ichthyophthirius multifiliis* purificados a partir de una cromatografía de inmutafinidad con anticuerpos monoclonales. En este caso el porcentaje de protección fue del 72% con respecto al grupo control sin inmunizar. Sin embargo, y como se comentó anteriormente, en *I. multifiliis*, solo se ha visto protección frente al mismo serotipo (Wang et al., 2002; Xu et al., 2009). En 2012, Priya, obtuvo protección en peces frente a *Cryptocaryon irritans* utilizando una vacuna de ADN que codificaba para un i-antígeno.

Son muchos los estudios encaminados a determinar si los i-antígenos inducen protección. En 1997, He et al. utilizaron un recombinante del i-antígeno de 48 kDa para inmunizar carpa dorada (*Carassius auratus*) y obtuvieron un 40% más de protección frente a *I.*

multifiliis. Con el fin de mejorar la protección, en 2017, y tras el análisis proteómico de una cepa de este parásito, Jørgensen et al., inmunizaron trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) con una mezcla de tres proteínas recombinantes. Se obtuvo un suero que presentaba anticuerpos específicos frente a los tres recombinantes y la vacuna generó una protección parcial frente a *I. multifiliis*, por lo que los autores sugirieron el uso de vacunas que contengan i-antígenos purificados y proteínas recombinantes de manera conjunta para alcanzar mayores niveles de protección. En estudios llevados a cabo con parásitos de los géneros *Plasmodium*, *Trypanosoma* y *Leishmania*, también se ha puesto de manifiesto la inmunidad protectora de los antígenos de superficie recombinantes (Musoke et al., 1992; Mello et al., 2004). Recientemente, en 2019, Mo et al., diseñaron una vacuna a partir de una proteína recombinante que codificaba para un i-antígeno que generó protección en peces de la especie *Oxymonacanthus longirostris* frente a *Cryptocaryon irritans*.

También se han llevado a cabo ensayos de vacunación que han utilizado como antígeno VSPs, obteniéndose buenos resultados. En 2010, Rivero et al., analizaron la protección que generaban dos formulaciones vacunales que administraron por vía oral en jerbos. Por un lado, inmunizaron con una mezcla de VSPs nativas purificadas a partir de trofozoitos de *Giardia* y, por el otro, con trofozoitos que habían sido modificados genéticamente para que expresasen varias VSPs a la vez. En ambos casos la vacunación fue eficaz y generó altos niveles de protección frente a *Giardia lamblia*. Esto supone una evidencia experimental de que la variación antigénica es esencial para la supervivencia del parásito dentro de los hospedadores.

En base a toda esta información, decidimos buscar antígenos en *Philasterides dicentrarchi* localizados en la superficie del ciliado y que pudieran ser buenos candidatos para ser incluidos en vacunas.

6.3. MATERIALES Y MÉTODOS

6.3.1. Diferencias entre cepas (I1, C1 y B1) y ciliados (I1) procedentes de una infección (pase 0; p0) y ciliados que permanecieron dos años en cultivo (pase 45; p45)

6.3.1.1. Estimación del grado de mortalidad entre cepas y aislados

Cuatro grupos de 10 rodaballos fueron infectados de manera experimental con aislados de ciliados procedentes de otra infección (I1p0 o C1p0) o con aislados de larga duración en cultivo (I1p45 o B1p100). Para ello, los peces fueron inyectados intraperitonealmente con 0,1 mL de ciliados a una concentración de 10^6 ciliados/mL en PBS (Paramá et al., 2003).

6.3.1.2. Análisis del perfil electroforético de proteínas de la cepa I1 y B1 mediante SDS-PAGE

Los ciliados de la cepa I1 (p0), C1 (p0) y B1 (p100) se centrifugaron a $700 \times g$ durante 5 minutos y se resuspendieron en PBS conteniendo un cóctel inhibidor de proteasas (Sigma-Aldrich). Posteriormente, los ciliados se lisaron por ultrasonidos en un sonicador Branson W-250 (Branson Ultrasonic Corporation, EE. UU.) (Iglesias et al., 2003a). Los ciliados lisados de cada aislado se diluyeron en tampón de carga (con DTT 0,6M) y se cargaron en los pocillos de un minigel de poliacrilamida lineal al 12,5%. La electroforesis se llevó a cabo como se describe en el apartado 4.3.6.4.

6.3.1.3. Ensayos de aglutinación

Los ciliados de la cepa I1 (p0), C1 (p0) y B1 (p100) se lavaron 3 veces con medio L-15 incompleto y se dispusieron en microplacas de 96 pocillos (Corning, EE.UU.) para llevar a cabo el ensayo de aglutinación como se describe en el apartado 5.3.2.

6.3.2. Antígeno Fab2

6.3.2.1. Purificación de proteínas antigénicas mediante cromatografía de afinidad

Para este experimento, se obtuvieron los fragmentos Fab de IgM sérica de rodaballos previamente inmunizados con *P. dicentrarchi*,

según se describe en de Felipe (2018). Estos fragmentos Fab se acoplaron a una columna de sefarosa, la cual fue utilizada para separar las proteínas antigénicas de *P. dicentrarchi*, tras pasar un extracto de ciliados lisados. A este antígeno se le denominó antígeno Fab2.

6.3.2.2. Caracterización de las proteínas antigénicas del ciliado

6.3.2.2.1. *Ensayo de aglutinación pre-incubando el suero inmune de rodaballo con antígeno Fab2*

Los ciliados de la cepa I1 (p0), se lavaron 3 veces con medio L-15 incompleto y se dispusieron en microplacas de 96 pocillos (Corning, EE.UU.) (200 ciliados por pocillo en un volumen final de 50 μ l de medio L-15 incompleto). Para el ensayo se utilizó un suero inmune de rodaballo (SIR) inactivado (como se describe en el anterior apartado) incubado con antígeno Fab2 (1 mg/mL) durante toda la noche a 4 °C en agitación. Se añadió SIR a diferentes diluciones, tratado con antígeno Fab2 o sin tratar, a los ciliados y se llevó a cabo un seguimiento de la aglutinación a los 15, 30 y 60 min al microscopio invertido. En todos los ensayos, se incluyó un control de ciliados en medio L-15 incompleto en ausencia de suero.

6.3.2.2.2. *SDS-PAGE y Western Blot con SIR*

Siguiendo el protocolo descrito en el apartado 4.3.6.4., el antígeno Fab2 se cargó en los pocillos de un minigel de poliacrilamida al 12,5%, después de calentar las muestras durante 5 min en un baño de agua hirviendo. Tras la separación de las proteínas mediante electroforesis, uno de los carriles se tiñó con BlueSafe (NZYTech, Portugal) y el otro se transfirió a una membrana de PVDF para el Western Blot con suero de rodaballo. Para ello, tras el bloqueo y los correspondientes lavados, se incubó la muestra con suero inmune de rodaballo (apartado 5.3.1.) en TBS-T 0,2% a una dilución 1:100 y se incubó durante toda la noche a 4 °C en agitación. Al día siguiente, se lavó 3 veces, 5 minutos cada una, con TBS-T 0,05% en agitación, y se incubó con suero monoclonal de ratón anti-rodaballo (UR3) (dilución 1:1000) durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavó y se añadió el anticuerpo secundario de conejo anti Ig G de ratón conjugado con

peroxidasa (Dakopatts, EEUU). Finalmente, las bandas se revelaron mediante DAB (Sigma-Aldrich).

6.3.2.2.3. *Espectrometría de masas*

Una muestra de antígeno Fab2 liofilizada fue enviada al servicio de proteómica de la Universidad Complutense de Madrid para su análisis mediante espectrometría de masas. Las proteínas que conforman el antígeno fueron separadas mediante electroforesis en un gel SDS-PAGE. Posteriormente, una banda fue cortada y tratada con tripsina para obtener las proteínas del gel, las cuales fueron analizadas mediante nano-cromatografía líquida (nano Easy-nLC 1000, Thermo Scientific) acoplada a un espectrómetro de masas de alta resolución Q-Exactive HF (Thermo Scientific, Mississauga, ON, Canadá). Por último, se llevó a cabo la secuenciación e identificación de las proteínas.

6.3.3. Estudio de la expresión diferencial entre ciliados de la cepa I1 de pase 0 o pase 45 mediante hibridación sustractiva por supresión (SSH)

6.3.3.1. Extracción de ARN

Para la obtención del ARN se utilizó el kit comercial NucleoSpin RNA® (Machery Nagel). Las muestras usadas fueron 10⁶ ciliados I1p0 y 10⁶ ciliados I1p45.

6.3.3.2. Evaluación de la calidad del ARN

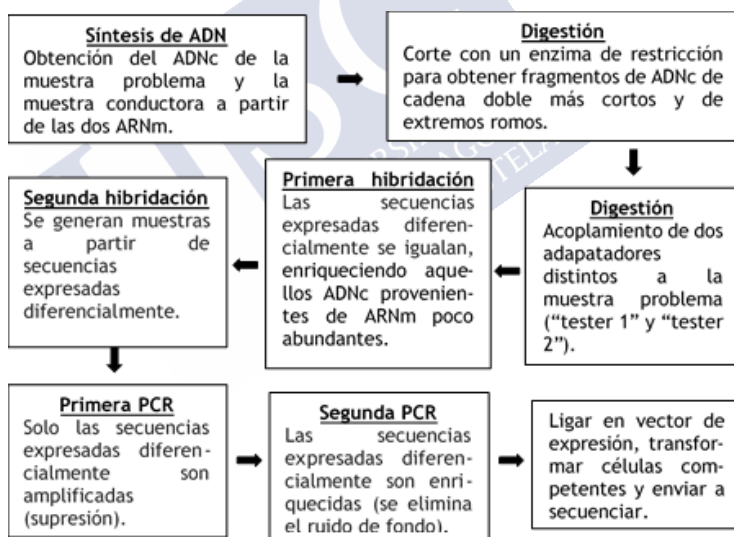
Debido a la sensibilidad de la técnica es necesario que el ARN esté en perfectas condiciones. Con este fin, se evaluó la calidad de la muestra mediante un gel de agarosa. Para ello, se incubó la muestra con 16 µL de tampón de carga (trazas de una solución saturada de azul de bromofenol; EDTA 500 mM pH 8.0; formaldehído al 37%; glicerol al 5% y formamida al 7,5% en tampón TAE (Tris 40 mM, ácido acético 19 mM y EDTA 1 mM; pH 7.5)) a 70 °C durante 10 minutos. La muestra se cargó en un gel de agarosa al 1% en tampón (200 mM MOPS, 50 mM de acetato de sodio, 10 mM EDTA y agua con DEPC; pH 7.0), con un 0,75% de formaldehído al 37% y Real Safe para poder ser revelado en un transiluminador, y se llevó a cabo la electroforesis a 50 V y 40 mA durante 50 minutos.

6.3.3.3. Extracción de ARNm

Una vez comprobado que el ARN era de calidad, se procedió a obtener el ARNm con el kit comercial NucleoTrap mRNA® (Machery Nagel). El ARNm obtenido se concentró en un tubo Amicon®Ultra-0,5mL Centrifugal Filters de 10K mediante centrifugación para tener la concentración necesaria para la hibridación sustractiva (2 µg de ARNm).

6.3.3.4. Protocolo de hibridación sustractiva

Se partió de dos poblaciones de ARNm (I₁ pase nuevo e I₁ pase viejo), utilizando como muestra problema (“tester”) la muestra procedente de I₁ pase nuevo (p0) y como muestra conductora (“driver”) la muestra procedente de I₁ pase viejo (p45). Los pasos a seguir para llevar a cabo el protocolo fueron los siguientes:



En primer lugar, ambas muestras, se transcribieron de forma inversa en ADNc monocatenario. Para ello, se incubaron 3,8 µL de ARNm con 1,2 µL de los cebadores de síntesis de ADNc del kit comercial durante 2 minutos a 70 °C y, a continuación 2 minutos en hielo. Seguidamente, se añadieron 2 µL de tampón 5X First Strand, 1 µL de DTT (20 mM), 1 µL de la mezcla de desoxinucleósido trifosfato

10mM (dNTPs, NZYTech) y 1 μ L de SMARTscribe Reverse Transcriptase (100 unidades/ μ L), y se incubó durante 1 h y 30 minutos a 42 °C. A continuación, y para la síntesis del ADNc de la segunda cadena, se añadieron 48,4 μ L de agua del kit, 16 μ L de tampón 5X Second Strand, 1,6 μ L de dNTPs (10 mM) y 4 μ L del tampón 20X Second Strand Enzyme Cocktail, y se incubó a 16 °C durante 2 horas. Después, se añadieron 2 μ L de T4 DNA polymerase (3 unidades/ μ L), se mezcló y se incubó 30 minutos a 16 °C. Finalmente, y para extraer los ADNc, se añadieron 4 μ L de tampón 20X EDTA Glicogen y 100 μ L de PCIA (Fenol-cloroformo-alcohol isoamílico), se centrifugó a 14000 rpm 10 minutos a temperatura ambiente, se recogió la fase superior a un nuevo tubo y se añadieron 100 μ L de cloroformo-alcohol isoamílico. Se centrifugó nuevamente, se recogió la fase superior y se añadieron 40 μ L de NH_4OAc (4 M) y 300 μ L de etanol al 95%. Por último, se centrifugó a 14000 rpm 20 minutos a temperatura ambiente y se recogió el sobrenadante a un nuevo tubo, al cual se añadieron 500 μ L de etanol al 80%. Se centrifugó 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar al aire 10 minutos. El precipitado se disolvió en 50 μ L de agua. 6 μ L de muestra fueron reservados en un tubo aparte analizar las muestras en un gel.

El siguiente paso fue digerir las muestras para obtener fragmentos de ADNc de cadena doble más cortos y de extremos romos que son óptimos para la sustracción y requeridos para el ligamiento al adaptador. De ambas muestras, por separado, se pipetearon 43,5 μ L y se mezclaron con 5 μ L de tampón 10X de Rsa I y 1,5 μ L de Rsa I 810 unidades/ μ L), y se incubaron durante 1 h y 30 minutos a 37 °C. Transcurrido este tiempo, se apartó una alícuota de 5 μ L para confirmar en un gel. Al resto de la muestra se le añaden 2,5 μ L de tampón 20X EDTA-Glicogen y 50 μ L de PCIA, y se centrifugaron a 12000 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente. La fase acuosa se pasó a un nuevo tubo, se añadieron 50 μ L de cloroformo-alcohol isoamílico y se centrifugó de nuevo. Finalmente, se añadieron 25 μ L de NH_4OAc (4M) y 187,5 de etanol al 95%, se centrifugó y se eliminó el sobrenadante. El precipitado se cubrió con 200 μ L de etanol al 80%, se centrifugó 5 minutos y se eliminó el sobrenadante. El precipitado se

dejó secar de 5 a 10 minutos, se disolvió en 5,5 μL de agua t se almacenó a -20°C . Una alícuota se utilizó para comprobar la digestión en un gel de agarosa.

De la muestra problema (“tester”) se diluyó 1 μL de ADNc digerido con Rsa I en 5 μL de agua. A continuación, se incubaron por un lado 2 μL con 2 μL de adaptador 1 (10 μM) y 6 μL de la mezcla de ligamiento (6 μL de agua, 4 μL de tampón 5X de ligamiento y 2 μL de T4 ligasa (400 unidades/ μL)) y, por otro lado, 2 μL con 2 μL de adaptador 2 (10 μM) y 6 μL de la mezcla de ligamiento a 16°C toda la noche. Al día siguiente, se añadió 1 μL de EDTA-glicogen a cada tubo y se calentaron a 72°C 5 minutos.

Una vez preparadas las muestras, y para llevar a cabo la hibridación sustractiva, se pasó 1 μL de la muestra conductora a 1mL de agua (D), 1 μL de la muestra problema incubada con el adaptador 1 a 100 μL de agua (T1) y 1 μL de la muestra problema incubada con el adaptador 2 a 100 μL de agua (T2).

Primero se mezcló 1 μL de tampón 4X Hibridation con 1,5 μL de la muestra D y 1,5 μL de las muestras T1 y T2 por separado; se añadió una gota de aceite mineral, se centrifugó y se dejó 1 minuto y 30 segundos a 98°C y, a continuación, durante 8 horas a 68°C para que tuviese lugar la hibridación. Después, se desnaturalizó la muestra D. Para ello, se cogió 1 μL y se mezcló con 1 μL de tampón 4X Hibridation y 2 μL de agua. De esta mezcla se cogió 1 μL y se pasó a un tubo de 0,5 mL, se cubrió con una gota de aceite mineral y se incubó durante 1 minuto y 30 segundos 98°C .

Posteriormente, y con una pipeta en 15 μL , se cogió suavemente, atravesando la interfaz creada por el aceite mineral, la muestra B2. Se sacó la pipeta del tubo y se dejó pasar un poco de aire. A continuación, se metió la pipeta en el tubo de la muestra C desnaturalizada y se pipeteó toda la muestra, teniendo así la muestra T2 y la muestra C separadas por una pequeña cámara de aire. Posteriormente, se transfirió al tubo de la muestra T1, se mezcló y se incubó a 68°C toda la noche. Finalmente,

la muestra se diluyó en 200 μL de tampón de dilución, se incubó 7 minutos a 68 °C y se conservó a -20 °C.

En este punto tendríamos el ADNc de doble cadena específico de los ciliados de pase nuevo con ambos adaptadores. Para amplificarlo, se llevaron a cabo 2 PCR con cebadores específicos para la secuencia de adaptadores.

Para la primera PCR, se mezcló 1 μL de muestra con 0,5 μL de 50X Advantage cDNA Polymerase Mix; 1 μL de PCR primer 1 (10 μM); 0,5 μL de la mezcla de dNTPs (10 mM); 2,5 μL del tampón 10X PCR reaction y 19,5 μL de agua destilada estéril. A continuación, se añadieron 50 μL de aceite mineral y se metió el tubo en un termociclador. Primero se llevó a cabo una incubación de 5 minutos de 75 °C para extender los adaptadores. Inmediatamente después comenzó la amplificación según el siguiente programa: etapa inicial a 94 °C durante 30 segundos; 35 ciclos de 10 segundos a 94 °C, 30 segundos a 60 °C y 90 segundos a 72 °C. 8 μL del producto de PCR fueron reservados para ser analizado en un gel de agarosa al 2% en TAE. La muestra restante se conservó a -20°C. A continuación, se diluyeron 3 μL del producto de la primera PCR en 27 μL de agua destilada estéril. Para la segunda PCR, se mezcló 1 μL del producto de la primera PCR diluido con 0,5 μL de 50X Advantage cDNA Polymerase Mix; 1 μL de Nested PCR primer 1 (10 μM); 1 μL de Nested PCR primer 2 (10 μM); 0,5 μL de la mezcla de dNTPs (10 mM); 2,5 μL del tampón 10X PCR reaction y 18,5 μL de agua destilada estéril. A continuación, se añadió una gota de aceite mineral y se metió el tubo en un termociclador con el siguiente programa: 12 ciclos de 10 segundos a 94 °C, 30 segundos a 68 °C y 90 segundos a 72 °C; con una elongación final de 10 minutos a 72 °C. 8 μL del producto de PCR fueron reservados para ser analizado en un gel de agarosa al 2% en TAE. La muestra restante se conservó a -20 °C.

Para comprobar la eficacia de ligamiento los productos de la segunda PCR se amplificaron mediante una PCR adicional usando un conjunto de cebadores específico para el gen de la β -tubulina, lo que permite verificar que al menos un 25% del ADNc tiene los adaptadores

a ambos extremos. Para ello, se diluyó 1 μL de ADNc ligado en 200 μL de agua destilada estéril y se combinó con los siguientes compuestos en cuatro tubos diferentes de la siguiente manera:

Componentes	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4
Tester 1 con adaptador 1	1	1	-	-
Tester 1 con adaptador 2	-	-	1	1
3'Primer específico para el adaptado (β -tubulina)	1	1	1	1
5'Primer específico para el adaptador (β -tubulina)	-	1	-	1
PCR primer 1 (10 μL)	1	-	1	-

La mezcla para los cuatro tubos (22 μL por tubo) contenía 0,5 μL de 50X Advantage cDNA Polymerase Mix; 0,5 μL de la mezcla de dNTPs (10 mM); 2,5 μL del tampón 10X PCR reaction y 18,5 μL de agua destilada estéril.

Finalmente, se añadió una gota de aceite mineral y se metió el tubo en un termociclador. Primero se llevó a cabo una incubación de 5 minutos de 75 $^{\circ}\text{C}$ para extender los adaptadores. Inmediatamente después, comenzó la amplificación según el siguiente programa: etapa inicial a 94 $^{\circ}\text{C}$ durante 30 segundos; 35 ciclos de 10 segundos a 94 $^{\circ}\text{C}$, 30 segundos a 60 $^{\circ}\text{C}$ y 90 segundos a 72 $^{\circ}\text{C}$. 5 μL del producto de PCR fueron reservados para ser analizado en un gel de agarosa al 2% en TAE.

Para el ligamiento en el vector de expresión y posterior clonado en bacterias se utilizó el kit comercial TOPO® TA Cloning ® (Invitrogen, Life Technologies), siguiendo las instrucciones. Se probaron diferentes cantidades del producto de PCR (0,5; 2 y 4 μL) mezclados con 1 μL solución salina, 1 μL de vector TOPO® y un volumen correspondiente

de agua hasta 6 μL . Los tubos se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente y el ligamiento se conservó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Por último, se transformaron células One Shot® Mach1™-T1^R competent Cells con el vector. Para ello, se añadieron por separado 2 μL de cada ligamiento a las células descongeladas y se incubaron 30 minutos en hielo. A continuación, se realizó un choque térmico de 30 segundos a $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ y luego se añadieron 250 μL de medio SOC. Los tubos se incubaron 1 h en agitación a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ y las células transformadas se sembraron en placas de LB y ampicilina suplementadas con 20 μL de X-Gal 50 μM y 40 μL de IPTG 0.1M y se incubaron toda la noche a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Al día siguiente se picaron las colonias (60) y se cultivaron toda la noche en LB con ampicilina. Al día siguiente, se extrajeron los plásmidos con el kit comercial GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific) y se enviaron a secuenciar.

6.3.4. Análisis del genoma y RNA-Seq

A partir de los resultados de los análisis del genoma (apartado 4.3.3.) y de los datos del RNA-seq de las cepas I1 y B1 obtenidos por De Felipe en 2018, se obtuvo información sobre las secuencias de distintos genes de las VSPs y de las leishmanolisinas a partir de la selección de aquellas secuencias que codifican proteínas con una relación potencial con estas familias de proteínas en ciliados utilizando la herramienta bioinformática BLASTx.

Además, también se trabajó con los datos obtenidos a partir de otro ensayo de RNA-seq en el que se analizaron ciliados procedentes de una infección a distintos tiempo (1h, 2h y 4 h dentro de la cavidad peritoneal del pez). En este caso, después de la anotación, se seleccionaron aquellas secuencias que codifican proteínas con una relación potencial con leishmanolisinas de ciliados.

6.3.5. Producción de la proteína recombinante r-VSP2

La secuencia completa de aminoácidos correspondiente a la VSP2.0, obtenida a partir del análisis mediante RNA-seq, fue confirmada mediante amplificación por PCR con cebadores específicos

y, posteriormente, utilizada para producir un recombinante en levaduras mediante el kit comercial *K. Lactis* Protein Expression kit (New England Biolabs, UK), como se describe en el apartado 4.3.5. Los cebadores utilizados para la síntesis de esta proteína recombinante fueron:

FVSP2KL 5'-
 CGCCTCGAGAAAAGAATGTTCAAAAAGATAGCTTTG -3' /
 RVSP2KL 5'-
 ATAAGAATGCGGCCGCTTAATGATGATGGTGATGGTGATGA
 TGGTGATGTAATGCCAAGGCGAAAACAGC -3'.

6.3.6. Caracterización de las VSPs

6.3.6.1. Análisis de la expresión de genes mediante RT-qPCR

Para el análisis de la expresión de genes de las VSPs se llevó a cabo una qPCR (apartado 4.3.7.2.) a partir del ADNc de trofozoítos de I1p0 y I1p45 utilizando como cebadores FVSP2: 5'-AAATCGCCTTATTAGCTCTCTTCTTAG-3' / RVSP2: 5'-AAAGCTAAAGCGAAAACAGCTA-3'.

6.3.6.2. Ensayos inmunológicos

6.3.6.2.1. Obtención del suero de ratón anti r-VSP2

Se siguió el protocolo descrito en el apartado 4.3.6.1., utilizando como antígeno la proteína recombinante r-VSP2.

6.3.6.2.2. Electroforesis bidimensional (2-DE) y Western Blot

Por un lado, se confirmó que el suero de ratón anti-VSP2 marcaba una proteína de peso molecular correspondiente a la proteína recombinante sintetizada. Para ello se llevó a cabo un Western Blot donde se incubó la proteína recombinante r-VSP2 con el suero anti-r-VSP2 diluido en TBS-T 0,2% a una concentración 1:200 (apartado 4.3.6.4.)

Por otro lado, se utilizó el suero (a la misma concentración) para localizar proteínas asociadas con la familia de la VSP en ciliados pasados recientemente por pez (I1p0) y ciliados de largo tiempo en cultivo (I1p45) a partir de un Western Blot en geles 2-DE (apartado 5.3.7.)

6.3.6.2.3. Ensayo de inmunofluorescencia

Para la inmunolocalización de la VSP2.0 se realizó un ensayo de inmunofluorescencia como se ha descrito previamente en el apartado 4.3.6.3., utilizando el suero de ratón anti-r-VSP2 a una dilución 1:100 en PBS sobre trofozoítos de la cepa I1 de *P. dicentrarchi*.

6.3.7. Análisis de la expresión de la familia de proteínas VSP en diferentes cepas y condiciones de cultivo

6.3.7.1. Mediante ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)

Para analizar la expresión de las proteínas de la familia de las VSPs, se utilizaron ciliados recién pasados por el pez (pase 0, p0) y ciliados a distintos pases en cultivo (pase 5, p5; pase 10, p10; pase 15, p15 y pase 45, p45) de la cepa I1. Además, se incubaron ciliados Ip45 con suero inmune de rodaballo (SIR). El ELISA se llevó a cabo como se describe en el apartado 4.3.7.1.1., utilizando el suero de ratón anti-r-VSP2 a una dilución 1:200 en TBS-T 0,2%.

6.3.7.2. Amplificación de ADNc y posterior secuenciación

La síntesis de ADNc a partir de los ciliados procedentes de las distintas condiciones de cultivo (I1 p0, I1p5, I1p10, I1p45, I1p45+SIR, C1p45, C1p45+SIR B1p100 y B1p100+SIR,) se llevó a cabo como se ha descrito anteriormente. En este caso la amplificación se llevó a cabo mediante PCR empleando el par de cebadores FVSP2/RVSP2.

Las mezclas de PCR (25 µL) contenían tampón de reacción de PCR (10 mM Tris-HCl; 50 mM KCl; 1,5 mM de MgCl₂ pH 9.0); 0,2 mM de cada desoxinucleósido trifosfato (dNTPs, NZYTech); 0,4 µM de cada cebador, 3 unidades de Taq polimerasa (ADN Taq polimerasa NZY, NZYTech, Portugal); el volumen correspondiente a 50 ng de ADN y el volumen restante de agua bidestilada estéril conteniendo dietilpíerocarbonato (DEPC). Las reacciones se sometieron a una serie de ciclos de temperaturas en un termociclador automático (Biometra, Alemania): desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 min seguidos de 35 ciclos a 94°C durante 30 s, 57 °C durante 45 s, y 72 °C durante 1 minuto; y una fase final de extensión de 7 min a 72 °C. El tamaño de

los productos de PCR fue comprobado por electroforesis en gel de agarosa al 4 % en TAE.

El producto de PCR fue ligado en el vector pSpark® II (Canvax Biotech) y clonado en células 5-alpha competentes (NZY5-alpha Competent Cells, NZYtech). Las bacterias transformadas se sembraron en placas de LB agar con ampicilina (suplementadas con 20 µL de X-Gal 50 µM y 40 µL de IPTG 0.1M). Posteriormente, se picaron 10 colonias y se llevó a cabo una PCR, para confirmar que contenían el inserto, utilizando los cebadores del vector. Una vez crecidas y extraídos los 10 plásmidos con el kit comercial GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific), estos se enviaron a secuenciar.

6.3.8. Análisis bioinformático

Tanto para el análisis bioinformático como para la realización de los alinamientos y estudios filogenéticos se utilizaron las herramientas descritas en los apartados 4.3.4. y 5.3.4.; además del programa CLUSTALW.

6.4. RESULTADOS

6.4.1. Comparativa de los resultados de mortalidad tras la infección con aislados I1p0, I1p45, C1p0 y B1p100 de *P. dicentrarchi*

En la siguiente gráfica (Figura 1) se representa el porcentaje de mortalidad de rodaballos infectados con ciliados procedentes de las cepas I1 (p0 y p45), C1 (p0) y B1 (p100). Como se puede observar, el 100% de mortalidad solo se alcanza al día 10 tras realizar la infección con ciliados procedentes de otra infección (tanto para la cepa I1 como C1). Este porcentaje disminuye considerablemente cuando la infección se realiza con ciliados procedentes de un cultivo de larga duración (I1p45). No se produjo mortalidad en el grupo inyectado con la cepa B1.

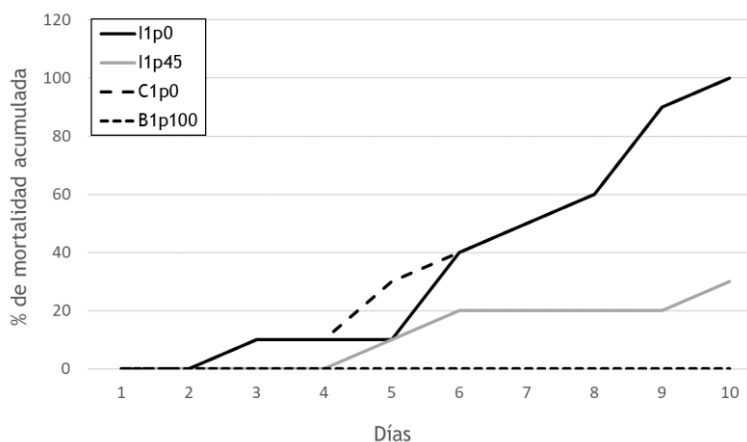


Fig. 1: Mortalidad expresada como porcentaje, obtenida tras la inoculación de rodaballos con 5×10^5 ciliados de un aislado de pase 0 (línea continua negra) o de pase 45 (línea continua gris) de la cepa I1 de *P. dicentrarchi*, o con ciliados de la cepa C1 (línea discontinua) o B1 (línea punteada) de *P. dicentrarchi*.

6.4.2. Análisis del patrón de bandas entre ciliados de la cepa I1, C1 y B1 de *P. dicentrarchi*

A partir del gel SDS-PAGE se pueden apreciar las diferencias en el patrón de bandas entre las cepas I1p0, C1p0 y B1p100. Como se puede observar en la figura 2, I1 y C1 comparten varias bandas; sin embargo, B1 presenta un patrón diferente.

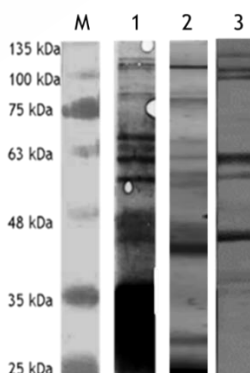


Fig. 2: SDS-PAGE: 1) Ciliados lisados de la cepa I1 (p0), 2) C1 (p0) y 3) B1 (p100). Marcador de peso molecular en kDa (M).

6.4.3. Porcentaje de aglutinación del SIR frente a las distintas cepas.

El SIR, generado a partir de la inmunización con la cepa I1, indujo una aglutinación del 100% de los ciliados, tanto de la cepa I1 como de la cepa C1, a las dos horas a una dilución 1:200. El suero fue capaz de aglutinar a los ciliados de ambas cepas hasta una dilución 1:600, siendo no significativas las diferencias entre ambas a ninguna dilución ni tiempo. El SIR no generó la aglutinación de los ciliados de la cepa B1 de *P. dicentrarchi* a ninguna concentración ni tiempo (Tabla 1).

Título SIR	1:100			1:200			1:400			1:500			1:600		
Tiempo (minutos)	30'	60'	120'	30'	60'	120'	30'	60'	120'	30'	60'	120'	30'	60'	120'
I1	42	76	100	35	67	100	25	58	90	8	25	65	0	15	35
C1	30	75	100	25	52	100	20	45	85	0	18	40	0	6	10
B1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabla 1: Porcentaje de aglutinación a distintos tiempos y distintas concentraciones de SIR para las cepas I1p0 y C1p0. El SIR no aglutinó a los ciliados de la cepa B1p100. Los valores se expresan como la media de cinco recuentos en distintos campos en el microscopio óptico invertido. No existen diferencias significativas entre las cepas I1 y C1 en cuanto al grado de aglutinación por parte del suero.

6.4.4. Inhibición de la aglutinación generada por el suero inmune de rodaballo al pre-incubarlo con antígeno Fab2

Al incubar los ciliados (I1) con SIR a una dilución 1:100, se observó un 100% de aglutinación de los ciliados a los 30 minutos. Sin embargo, cuando el SIR es incubado previamente con antígeno Fab2, para obtener ese porcentaje de aglutinación en ese tiempo es necesario utilizar el suero 8 veces más concentrado (dilución 1:12,5) (Figura 3).

6.4.5. Caracterización del antígeno Fab2

Para la caracterización del antígeno FAb2 se llevó a cabo un Western Blot utilizando suero de rodaballo inmunizado con I1 frente al antígeno Fab2. Los anticuerpos reconocieron una banda a 38 kDa (Figura 4A). Para conocer la secuencia de las proteínas que conforman esa banda, antigénica para el rodaballo, se llevó a cabo un análisis de espectrometría de masas a partir de un gel SDS-PAGE utilizando como antígeno Fab2 (Figura 4B). El análisis dio como resultado 12 proteínas

que tenían homología con proteínas de ciliados. Una de ellas pertenece a la familia de las VSP. Posteriormente, con los datos del RNA-seq, se identificó esta proteína como VSP3.0.

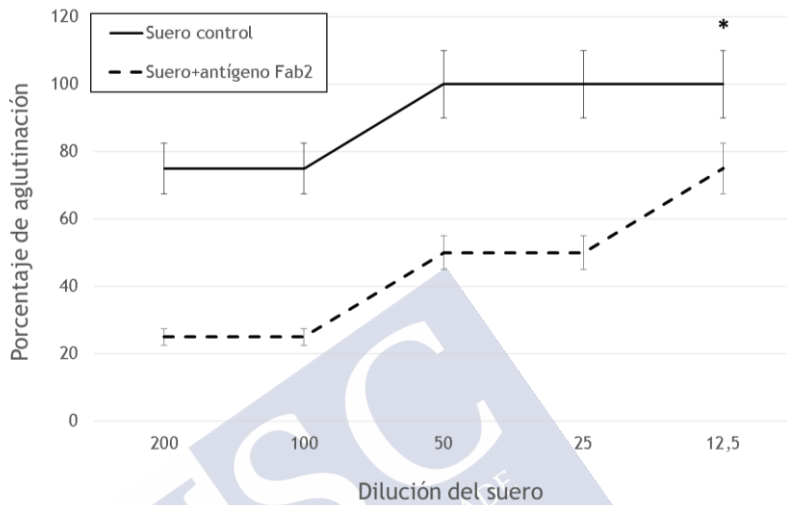


Fig. 3: Porcentaje de aglutinación del suero inmune de rodaballo (línea continua) y el suero inmune de rodaballo incubado con antígeno Fab2 (línea discontinua). Los resultados representados indican el valor de las medias \pm la desviación estándar. Los asteriscos indican el nivel de significación (* $P < 0,001$).

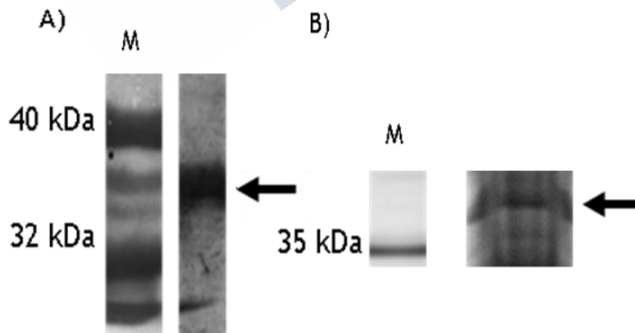


Fig. 4: A) Western Blot de las proteínas reconocidas por el suero inmune de rodaballo frente al antígeno Fab2. B) SDS-PAGE a partir del antígeno Fab2 llevado a cabo por el servicio de proteómica de la Universidad Complutense de Madrid para el posterior análisis de la banda mediante espectrometría de masas. En ambos casos, las flechas marcan la banda de 38 kDa. Marcador de peso molecular (M) en kDa.

6.4.6. Obtención de la secuencia parcial de la VSP1 a partir de los resultados de secuenciación de la hibridación sustractiva

A partir de la secuenciación de los plásmidos de la hibridación sustractiva se observó una expresión diferencial para distintos genes. Uno de ellos, se identificó como el gen que codifica para la proteína VSP1.0. Esta secuenciación dio como resultado una secuencia parcial a partir de la cual se obtuvo la secuencia completa mediante las anotaciones del RNA-seq.

6.4.7. Estudio de la modulación de genes entre cepas mediante RNA-seq

A partir de los resultados de expresión obtenidos mediante el análisis comparativo de RNA-seq entre las cepas I1, B1 y C1 de *P. dicentrarchi*, se analizaron los valores en Log_2 en términos de *fold-change*, los cuales determinan el grado de expresión diferencial de genes de una muestra con respecto a la otra, tomando como significativos los valores absolutos ≥ 2 .

Al llevar a cabo el tratamiento de datos comparando la expresión de genes entre las cepas I1 y B1, se observó que existe un grupo de genes que se modula en las dos muestras. Uno de los genes que se sobreexpresa con un valor de 3,34418 en B1 con respecto a I1 fue identificado como el gen que codifica para la proteína VSP2.0.

6.4.8. Análisis de las secuencias completas para las VSPs

A partir de los resultados de espectometría de masas, la hibridación sustractiva por supresión y el RNA-seq pudimos obtener las secuencias completas para tres genes que se expresan de manera diferencial bajo distintas condiciones o en distintas cepas y que codifican para tres proteínas variables de superficie. En la tabla 2 se recogen las características moleculares y bioquímicas obtenidas a partir del análisis bioinformático de 3 proteínas correspondientes a la VSP1.0, VSP2.0 y VSP3.0 de *P. dicentrarchi*. Las secuencias completas de aminoácidos presentan pesos moleculares cercanos a 28 kDa, con puntos isoeléctricos teóricos que van desde 5.17 a 7.17. En el caso de la proteína VSP1.0 se puede observar que presenta 19 sitios de unión a metal (todos ellos cisteínas). Son proteínas muy glicosiladas y poseen

un alto porcentaje de cisteínas. Todas presentan péptido señal y una región de transmembrana (Tabla 2).

	Número de aminoácidos	Peso molecular (kDa)	Punto isoelectrico teórico	Péptido señal	Hélice de trans-membrana	Sitios de unión a metales	% de cisteínas	Sitios de glicosilación
VSP1.0	272	28,3	7.17	1-18	259-276	Cisteínas (109,112,125, 130,140,143, 156,163,174, 177,190,197, 206,209,222, 229,237, 240,251)	10,8	52,67,70,71,80,85,89, 99,107,111,117,132,141, 142,165,182,184,185, 191,198,204,205,211, 212,216,217,242,245, 255
VSP2.0	266	27,8	5.47	1-24	248-266	-	10,5	20,60,63,92,99,133,140, 141,142,181,191,195, 198,200,201,204,205, 207,211,218,237,245, 247,248,249
VSP3.0	267	27,8	5.17	1-24	248-266	-	10,5	61,64,134,141,142,199, 201,202,205,206,208, 212,219

Tabla 2: Propiedades moleculares y bioquímicas de las proteínas VSPs de *P. dicentrarchi* obtenidos a partir del análisis bioinformático.

6.4.9. Caracterización de la proteína recombinante VSP2

El anticuerpo anti-r-VSP2 reconoció la proteína recombinante VSP2 (Figura 5A).

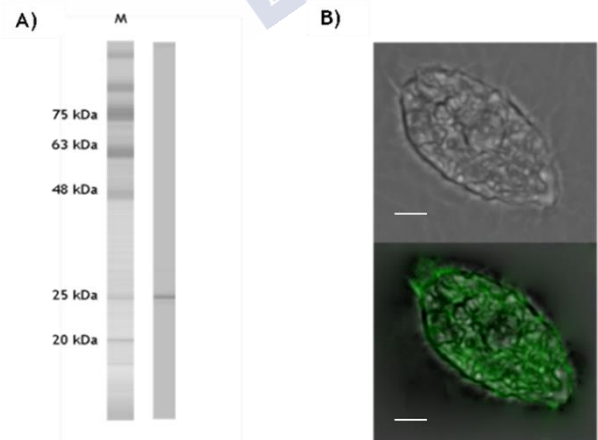


Fig. 5: A) Western Blot de la proteína recombinante r-VSP2 reconocida por el anticuerpo anti-r-VSP2. M: marcador de peso molecular (kDa). B) Microfotografías

realizadas al microscopio confocal a partir del ensayo de inmunofluorescencia. Tamaño de la barra: 10 μ m.

Se confirma así, mediante este Western Blot (Figura 5A), la proteína recombinante tiene un peso molecular de 27,8 kD. Además, el anticuerpo anti-r-VSP2 marcó la parte externa del ciliado, como se observa en las microfotografías realizadas al microscopio confocal tras el ensayo de inmunofluorescencia (Figura 5B), lo que también confirma que se trata de una proteína asociada a la membrana del ciliado.

6.4.10. Caracterización de proteínas de la familia de la VSP

El análisis de la expresión génica de las VSPs en ciliados procedentes de una infección (I1p0) y ciliados de largo periodo en cultivo (I1p45) mostró diferencias significativas entre ambas muestras (Figura 6).

El suero generado frente a la proteína recombinante VSP2 nos permitió localizar proteínas de la familia de la VSP dentro de un extracto total de ciliados lisados. Como se aprecia en los geles de 2-DE, el anticuerpo marcó proteínas tanto en la muestra de ciliados I1p0 como I1p45 (Figura 7).

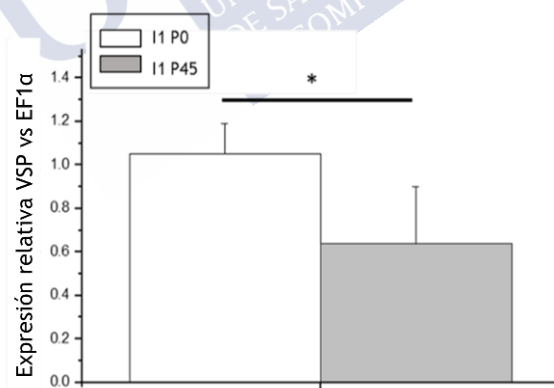


Fig. 6: A) Expresión relativa de genes que pueden codificar para las VSPs frente al gen de referencia EF1 α en ciliados pasados recientemente por pez (barra blanca) y ciliados que llevaban mucho tiempo en cultivo (barra gris). Las barras representan la media de los triplicados \pm la desviación estándar. El asterisco denota diferencias estadísticamente significativas (*P <0.001).

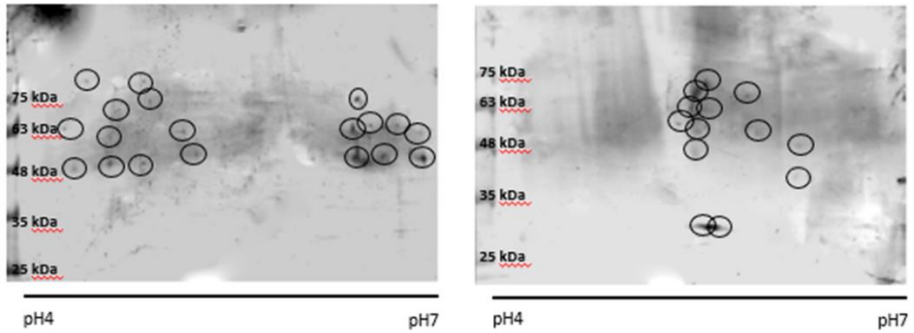


Fig. 7: Western Blot, a partir de un gel de 2-DE de ciliados lisados I1p0 (izquierda) y ciliados lisados I1p45 (derecha), con suero de ratón anti-r-VSP2. Con círculos se han señalado aquellas proteínas que presentan un mayor marcaje en cada muestra. Marcador de peso molecular en kDa.

Para realizar una estimación de la expresión de VSPs en ciliados de distintos pases y de p45 incubado con suero inmune de rodaballo, se llevó a cabo un ELISA, en el que se aprecia un aumento en la expresión de las proteínas de la familia de las VSPs a medida que los ciliados pasan más tiempo en cultivo. Sin embargo, cuando los ciliados de p45 son incubados con suero inmune de rodaballo la expresión cambia, alcanzando valores similares obtenidos en los ciliados de pase 5 (Figura 8).

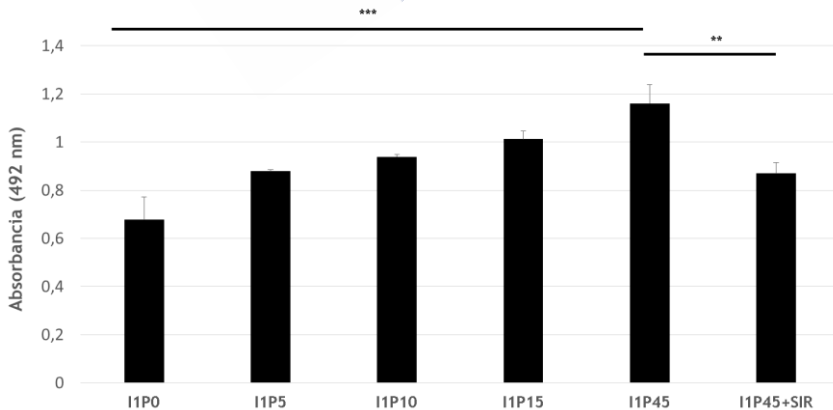


Fig. 8: ELISA para analizar la expresión de la proteína VSP2 en ciliados procedentes de una infección (p0), de distintos tiempos en cultivo (p5, p10, p15 y

p45) y ciliados de pase 45 incubados con suero inmune de rodaballo (SIR). Los valores se muestran como la media \pm la desviación estándar para tres replicas. Los asteriscos representan el grado de significación entre muestras: *** $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

6.4.11. Análisis comparativo de VSPs

A partir de las secuencias de nucleótidos, obtenidas de la secuenciación de 10 plásmidos de cada muestra, se obtuvieron las secuencias de aminoácidos utilizando la herramienta informática ExPASy. A partir de este análisis se obtuvieron a mayores las secuencias parciales para la VSP3.1, VSP3.2 y VSP5.0. La tabla 3 recoge el porcentaje de cada VSP en cada una de las muestras analizadas y la figura 9 el índice de variación para las VSPs en ciliados de la cepa I1 a distintos pases. Los resultados muestran que cuando los ciliados proceden de una infección (I1p0) estos expresan distintas VSPs que los mantenidos tiempo en cultivo. A medida que aumenta el tiempo en cultivo, y por lo tanto los pases, se observa que los ciliados expresan en el pase 10 y pase 15 solo isoformas VSP3 y en el pase 45 únicamente VSP4.0. Sin embargo, cuando los ciliados de pase 45 se incuban con SIR estos vuelven expresar solamente VSP3.0. Para la cepa C1, a la cual es capaz de aglutinar también el SIR, ocurre lo mismo ya que al incubarse ciliados de pase 45 con el suero estos pasan de expresar VSP4.0 a expresar VSP3.0. La cepa B1, la cual resultó no virulenta y cuyos ciliados no son aglutinados por el SIR, expresó siempre VSP4.0.

	I1p0	I1p5	I1p10	I1p15	I1p45	I1p45+SIR	C1p45	C1p45+SIR	B1 p100	B1p100+SIR
VSP2.0	14,29									
VSP3.0	28,56	90	90	100		100		100		
VSP3.1	14,29		10							
VSP3.2	14,29									
VSP4.0	14,29	10			100		100		100	100
VSP5.0	14,29									

Tabla 3: Porcentaje de expresión de cada VSP en cada condición de cultivo de diferentes aislados o cepas. El porcentaje se calculó a partir de los datos de secuenciación obtenidos de 10 plásmidos por muestra.

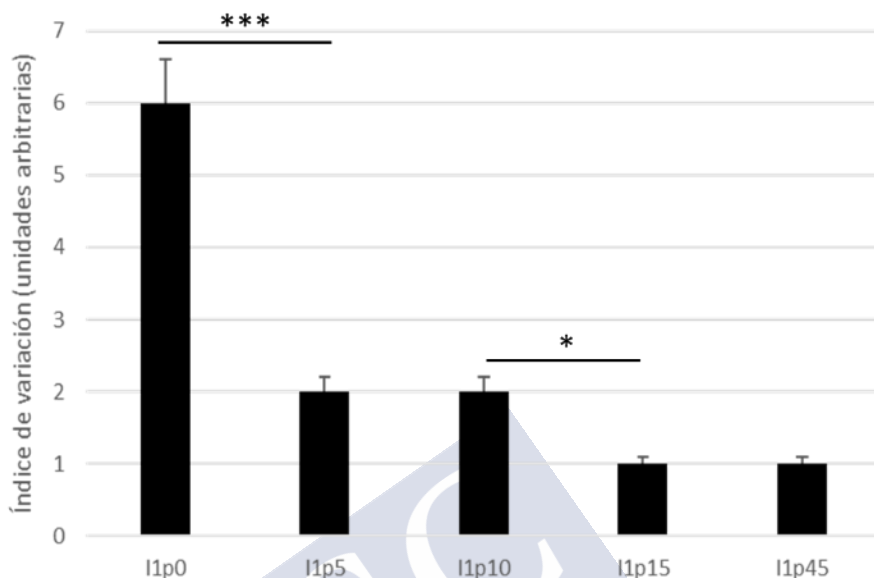


Fig. 9: Gráfica en la que se representa el índice de variación para las VSPs en distintos aislados procedentes de una infección (p0) o a distintos pases de la cepa I1 de *P. dicentrarchi*. Los asteriscos indican el nivel de significación entre las muestras (** $P < 0,05$; * $P < 0,001$).

El alineamiento de las secuencias se llevó a cabo con el programa CLUSTAL OMEGA (v.1.2.4) (Figura 10A). También se calculó el porcentaje de identidad entre secuencias con la herramienta Clustal 2.1 (Figura 10B) y se realizó el estudio filogenético entre las secuencias de las VSPs de *P. dicentrarchi* y las de otras especies de los géneros *Plasmodium* y *Giardia* (Figura 10C).

A)

```

VSP3.0----MFKKIALALFLAVVFSACTVGECCCTACNSEADPACTACDAAENYFIKEGACVL
VSP3.1-----ALLTLFLAVVFSACTVGECCCTACNSEADPACTACDAAENYFIKEGACVL
VSP3.2-----IALALFLAVVFSACTVGECCCTACNSEADPACTACDAAENYFIKEGACVL
VSP5.0-----
VSP2.0----MFKKIALALFLAVVFSACTVGECCCTACNSEADPACTACDAAENYFIKEGACVL
VSP4.0----MFKKIALALFLAVVFSACTKGSTGCECT-----
VSP1.0MKLAILLIGVILLQGSFAAYDQACTNN-LGCTANKCEAGNLKCDAAQCKAGYTRDAATEI

VSP3.0ITGCTAATAGVCDT---CDKAKFYFKKANNTCDLQTGCKTYTGDACTACDDTKSYIPKV
VSP3.1ITGCTAATAGVCDT---CDKAKFYFKKANNTCDLQTGCKTYTGDACTACDDTKSYILKV

```

```

VSP3.2ITGCTVATAGVGD-----CDKAKFYLEKANNTCDLQTGCKTYTGDACTACDDTKSYIPKV
VSP5.0---MQAVTAGVCDT-----CEKAKFYFKKANNTCDLQTGCKTYTGDACTACDDQSLIPKV
VSP2.0ITGCTAATAGVCDT-----CDKAKFYFKKANNTCDLQTGCKTYAADACTGCDQINSYYPKT
VSP4.0---TPEGQETCA---CNNTTFYFEKADNTCDLQTGCKTYAADACTGCDQINSYYPKT
VSP1.0CNANNCTTGLTDPNKGQCTTCKAWSLLTTGACVAKNCATADAGGDTSKCATCNAGYTL

VSP3.0ADNFSECKLLTNCKTVVEQKCTACAD-----AVTTTHSIQEGECLITCKSNEKHNDKTA
VSP3.1ADNFSCKLETNCKT-----
VSP3.2ADNFSECKLLTNCKTVVEQKCTACAD-----AVTTTHSIQEGECLITCKSNEKHNDKTA
VSP5.0ADNFSECKLLTNCNTVAESKCTACAD-----AVATTHSFQERECLE-----
VSP2.0ASDFSCKLIKNTCKTVVEQKCTACAD-----AVTTTHSIQEGECLKTCLKDQKHNDKTD
VSP4.0ASDFSVCCLIKNTCKTVVEQKCTVCAD-----AVTATHSIQEGECLKTCLKDQKHNDKTD
VSP1.0ATTKLCSMDNCTTGEADAICKTTCATGYKVKVDKTACVKQVDGCATDKTGEDGVCTECKL

VSP3.0CEADAENVNGIVGCITKPDGADADTKCKACKTGTTLATSATKCVTDVQNCQTYNDTECQT
VSP3.1-----
VSP3.2CGADAENVNGIVGCITKPDGADADTKCKACKTGTTLATSATKCVTDVQNCQTYNDTECQT
VSP5.0-----
VSP2.0CVADTEKVNIGVGCQAQADGADAATKCKTCKTGTSLATSAKCVTDVQNCQTYNDTECQT
VSP4.0CVADTEKVNIGVGCQAQADGADAATKCKTCKTGTTLATSATKCVTDVQDCLTYNDTECQT
VSP1.0GFTKSTDGKTCTGSIANCTEYETATTCKVCATTHAASDCKKACVTKVDNCSEYNATECTK

VSP3.0CKTGFKLNTTTKACDADKSSSSAIVSASLAVILAVFALAL-----
VSP3.1-----
VSP3.2CKTGFKLNTTTKACDADKSSSSAIVSASLAVI-----
VSP5.0-----
VSP2.0CKTGFKLNTTTKACDVTSSSSSAIVSASLAVILAVFALAL-----
VSP4.0CKPGFKLNTTTKACDVTSSSSSAIVSASLAVILAVFALASKSAVIYMQIHLQRNGTQK
VSP1.0CASGYTVKDKKCEKGSSSSSASALVFSAAIISVAAALI-----

VSP3.0-----
VSP3.1-----
VSP3.2-----
VSP5.0-----
VSP2.0-----
VSP4.0LFINLIFYIIQIFFQIISHKAKAKTAKITAKEAETIAEEEDLSASQALVVFNLPVLH
VSP1.0-----

VSP3.0-----
VSP3.1-----
VSP3.2-----
VSP5.0-----
VSP2.0-----
VSP4.0VQHSVSLQVWQFQTSVTHLVAGVAK
VSP1.0-----

```

B)

	VSP1.0	VSP2.0	VSP3.0	VSP3.1	VSP3.2	VSP4.0	VSP5.0
VSP1.0	100	32,91	32,19	28,18	31,53	31,71	28,17
VSP2.0		100	89,10	88,43	86,61	88,19	73,12
VSP3.0			100	96,69	92,56	76,69	84,95
VSP3.1				100	92,56	61,54	82,35
VSP3.2					100	75,45	80,65
VSP4.0						100	62,35
VSP5.0							100

C)

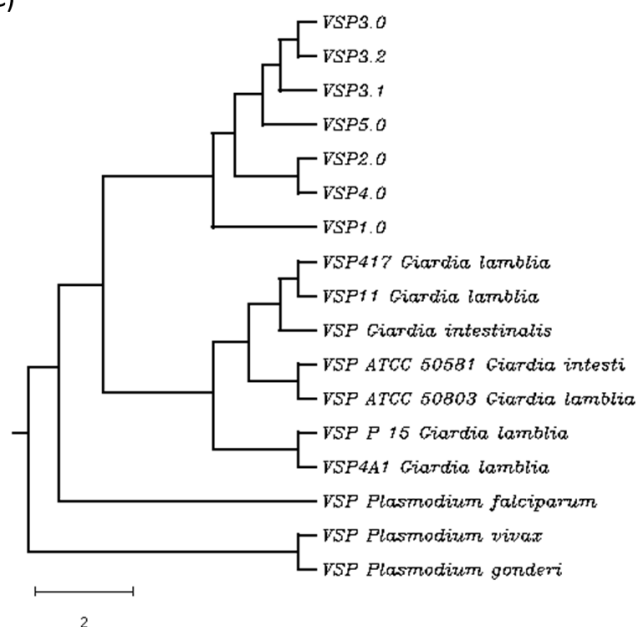


Fig. 10: A) Alineamiento de secuencias de aminoácidos que codifican para las distintas VSPs mediante el programa CLUSTAL OMEGA (v.1.2.4). B) Matriz de identidad porcentual creada con la herramienta Clustal 2.1. C) Análisis filogenético molecular con el programa CLUSTALW, utilizando el método UPGMA. El árbol, a escala, presenta longitudes de rama medidas en el número de sustituciones por sitio.

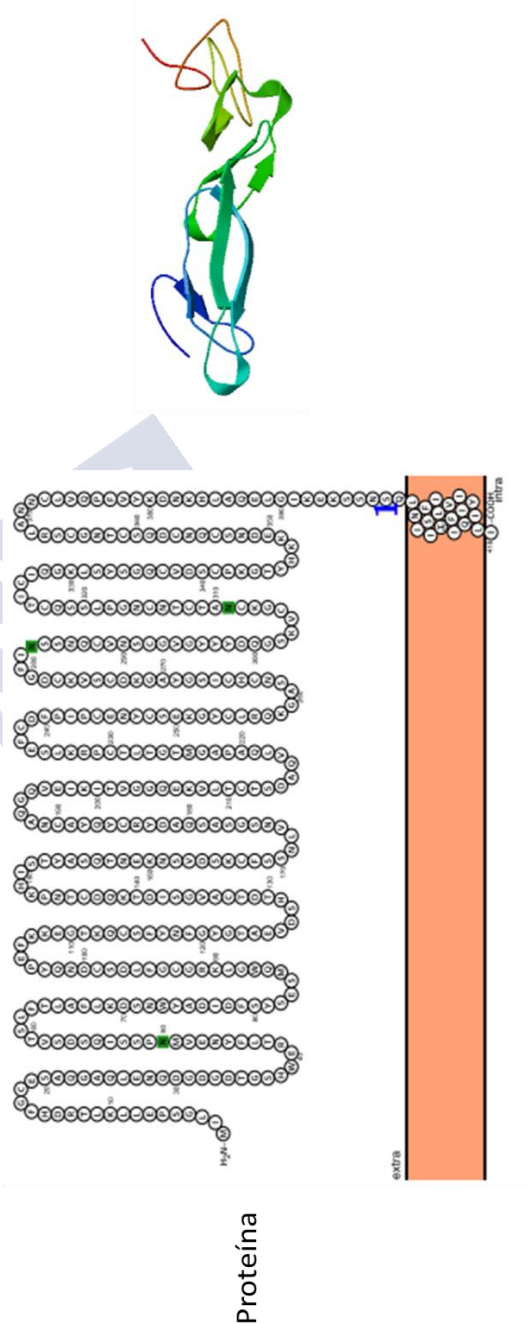
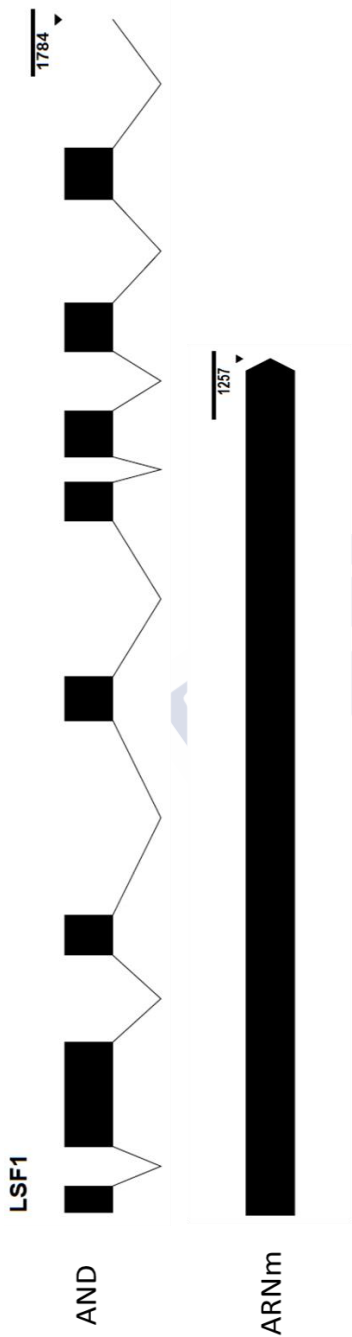
Secuencias parciales de estas 7 proteínas fueron ensambladas para generar un péptido quimérico, como se describe más adelante en el apartado 8.3.2.

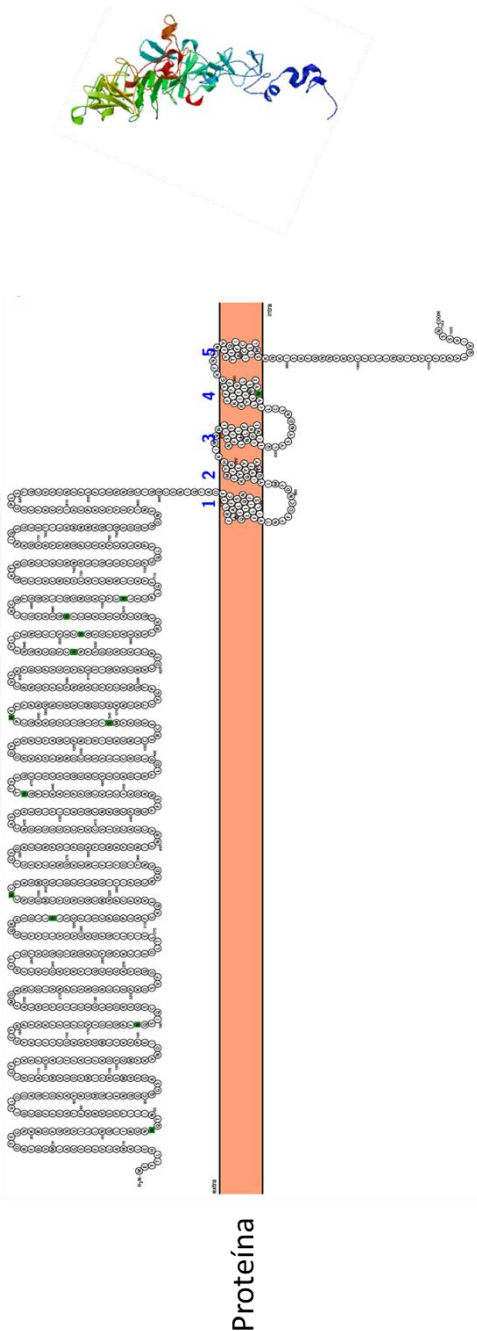
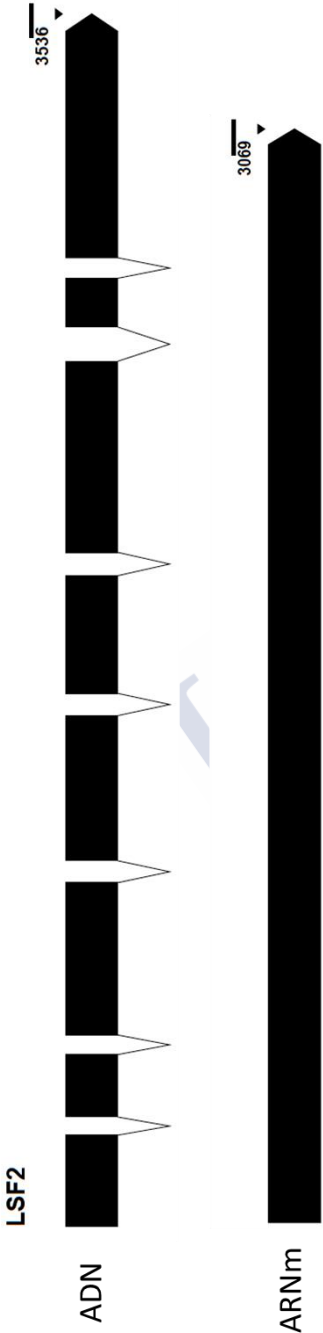
6.4.12. Análisis de las secuencias completas para las leishmanolisinas

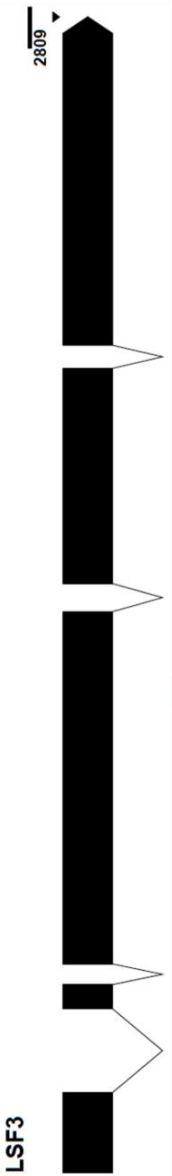
A partir del análisis del genoma y del transcrito se encontraron las secuencias completas de ADN y de ARN para distintos genes que codifican para proteínas de la familia de las leishmanolisinas de la cepa I1 de *P. dicentrarchi*. Gracias al estudio bioinformático se analizaron distintos parámetros físico-químicos de los genes y de las proteínas que codifican (Tabla 4) y se realizaron modelos predictivos de la disposición de las proteínas dentro de la célula, así como su posible estructura (Figura 11).

Nombre	Peso molecular (Daltons)	Punto isoelectrico teórico	Péptido señal	Hélices de trans-membrana	Sitios de glicosilación	Gen (bp)	ARNm (bp)	Exones/ intrones
LSF1	45806.08	5.34	No	Si	Si	1784	1257	9/8
LSF2	117193.02	7.92	No	Si	Si	3536	3069	8/7
LSF3	90730.40	5.13	No	Si	Si	2809	2433	5/4
LSF4	68634.30	8.40	No	Si	Si	2632	1866	12/11
LSF5	91197.18	5.31	No	No	Si	2790	2400	7/6
LSF6	97237.18	5.42	No	Si	Si	2834	2634	4/3
LSF7	70517.85	5.46	No	Si	Si	2851	1909	12/11
LSF8	86013.61	5.56	No	No	Si	2870	2328	9/8
LSF9	54129.34	5.33	No	Si	Si	1773	1479	5/4
LSF10	45140.65	5.00	No	No	Si	1854	1118	10/9
LSF11	67863.50	5.34	No	Si	Si	-	1821	-
LSF12	40155.26	5.15	No	Si	Si	1394	1095	6/5
LSF13	66470.53	7.59	No	No	Si	2286	1773	10/9
LSF14	65831.37	8.93	No	Si	Si	2138	1832	5/4
LSF15	57781.41	6.03	No	No	Si	1744	1512	4/3
LSF16	42555.05	5.24	No	Si	Si	1502	1149	6/5
LSF17	88079.12	5.01	No	No	Si	-	2319	-
LSF18	123584.93	5.07	Si	Si	Si	-	3339	-

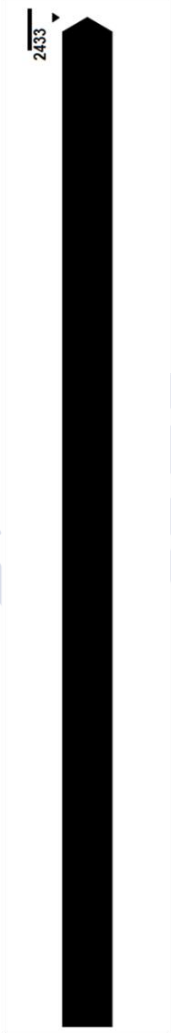
Tabla 4: Parámetros físico-químicos obtenidos del análisis bioinformático realizado a partir de las secuencias de genes que codifican para diferentes leishmanolisinas de la cepa I1 de *P. dicentrarchi*.



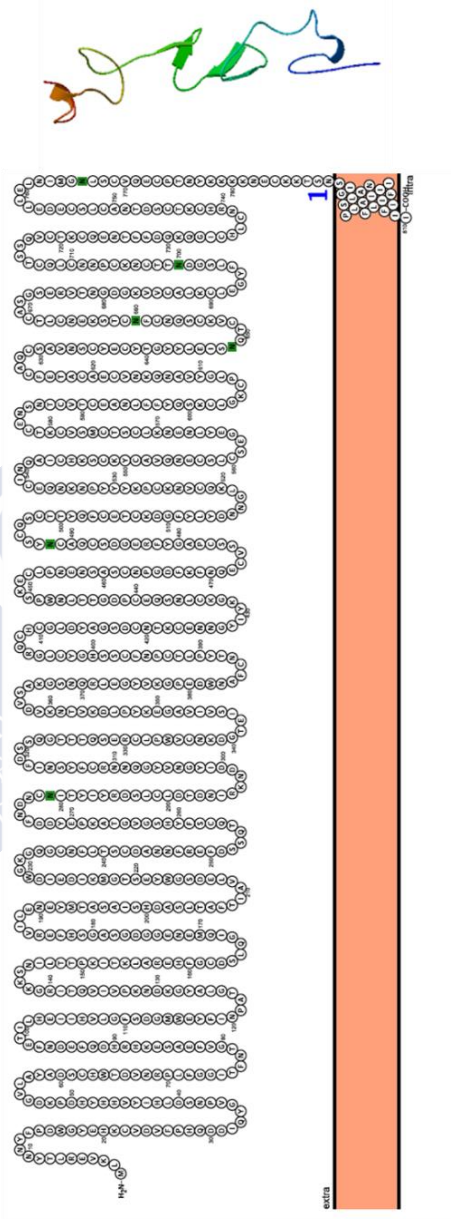




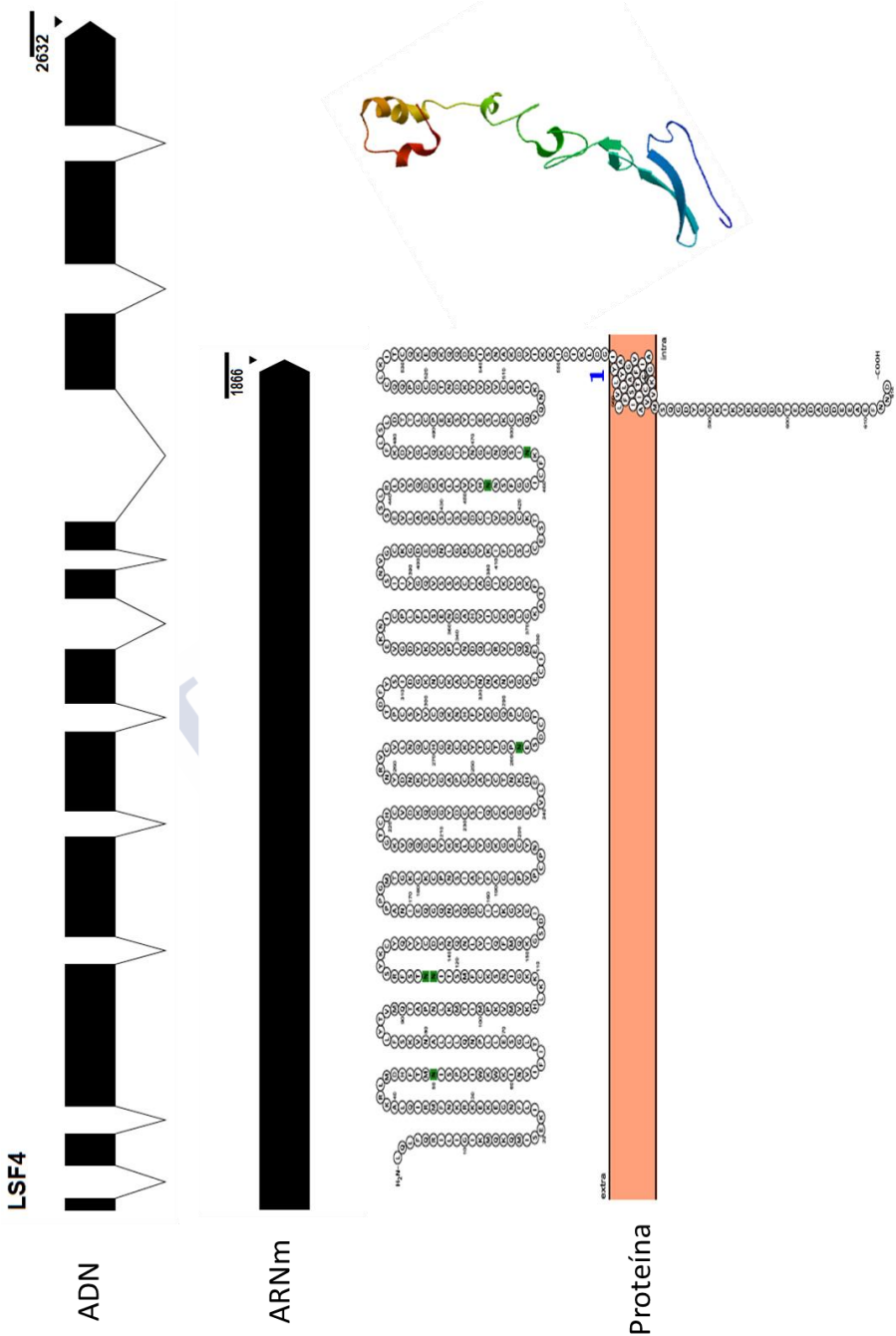
ADN

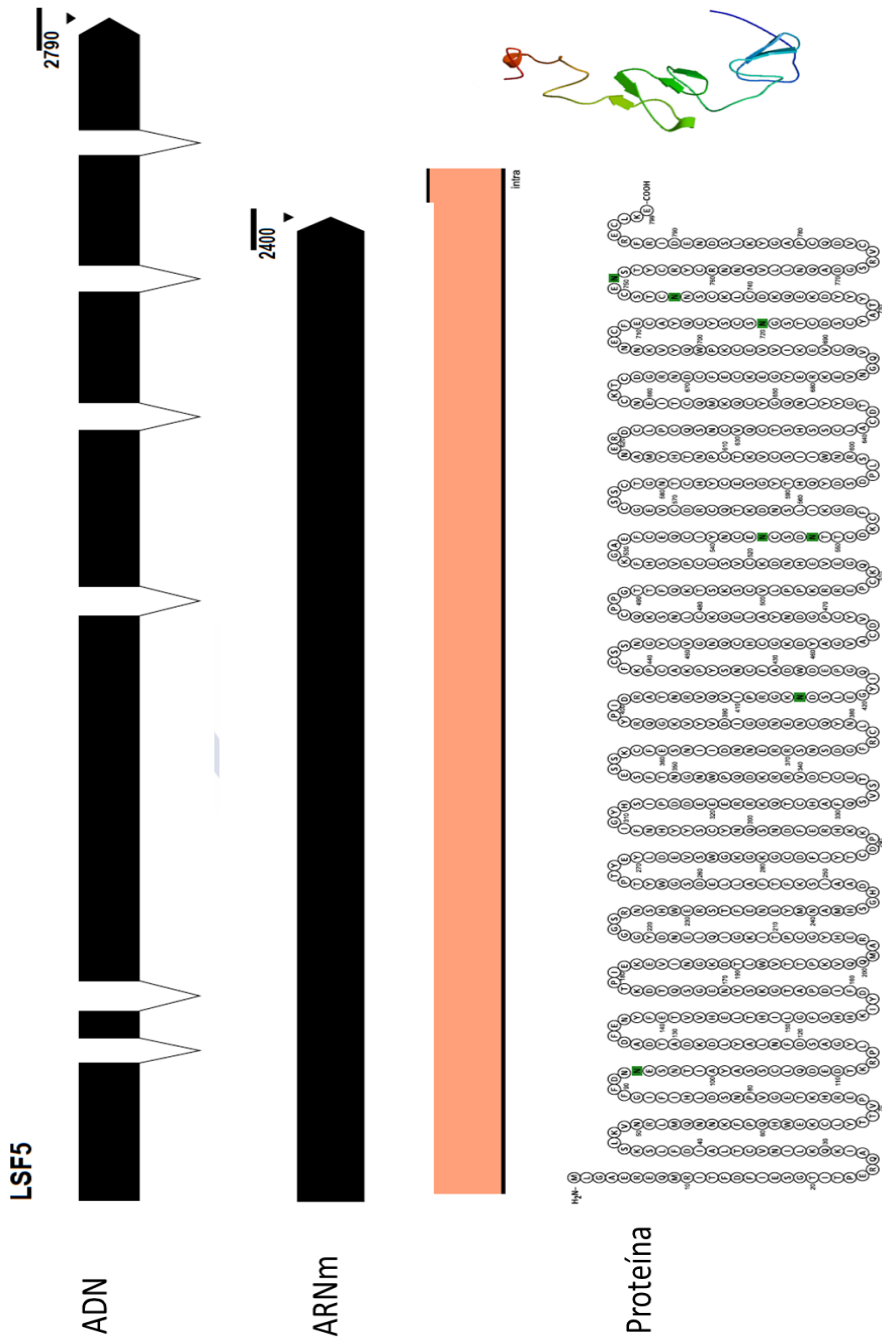


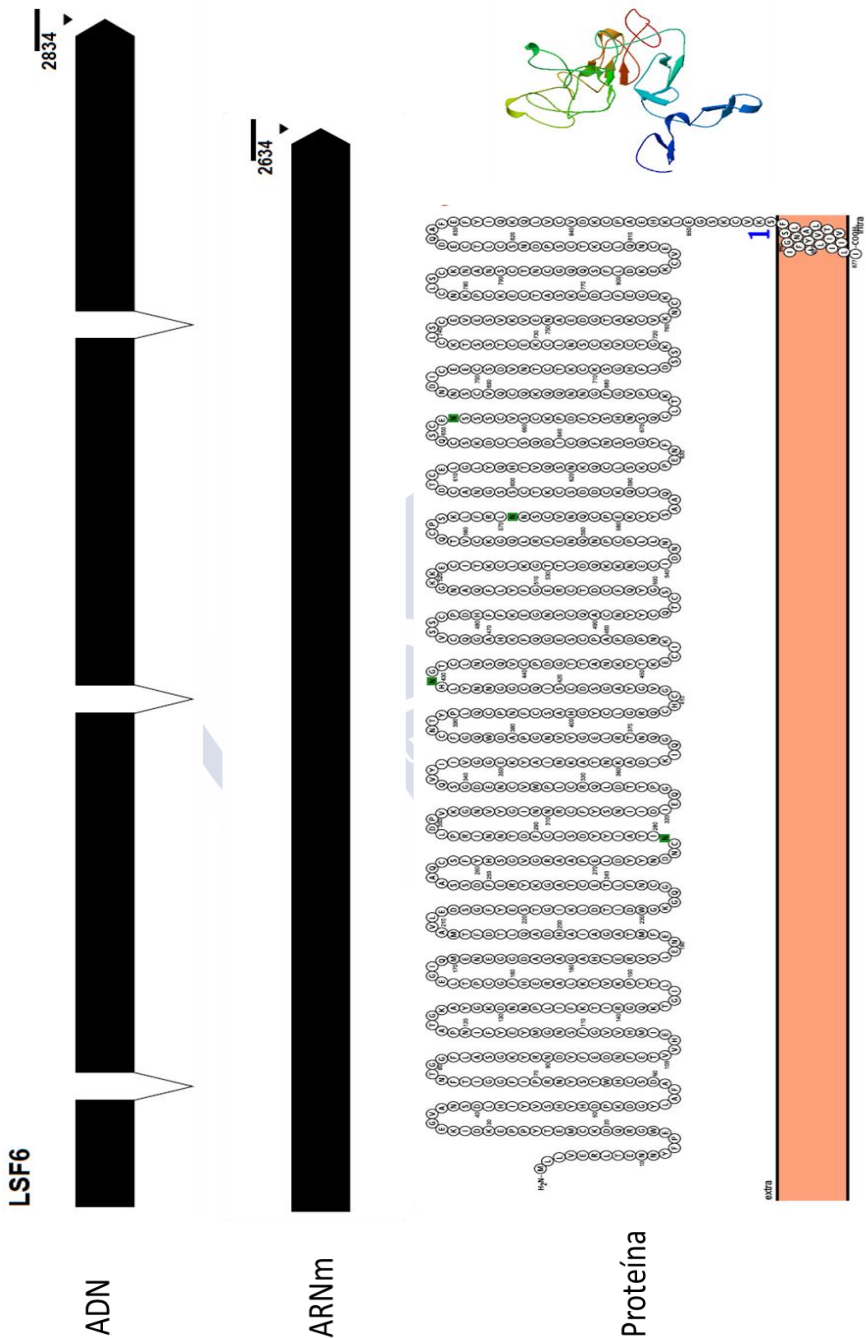
ARNm

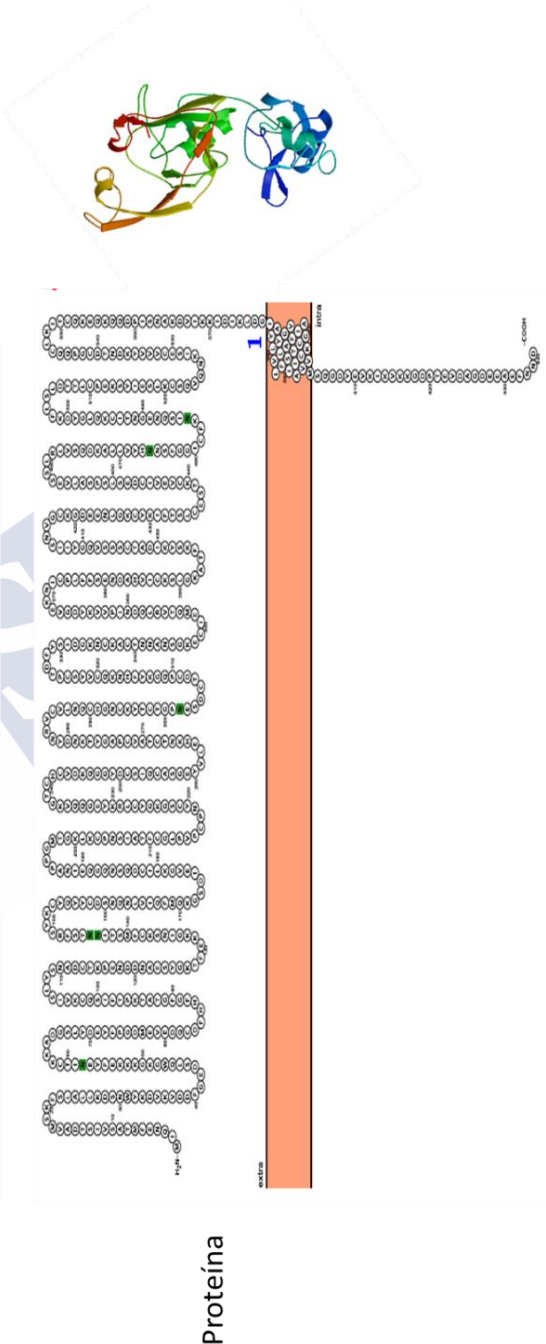
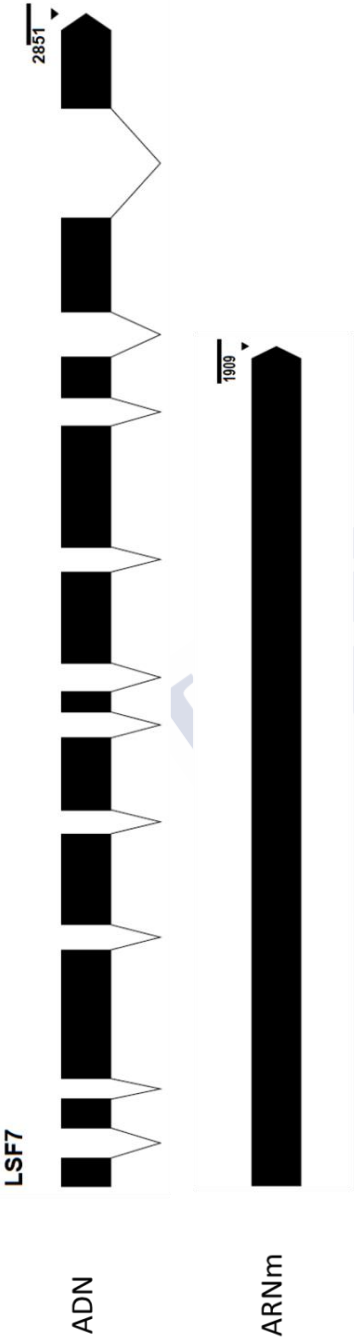


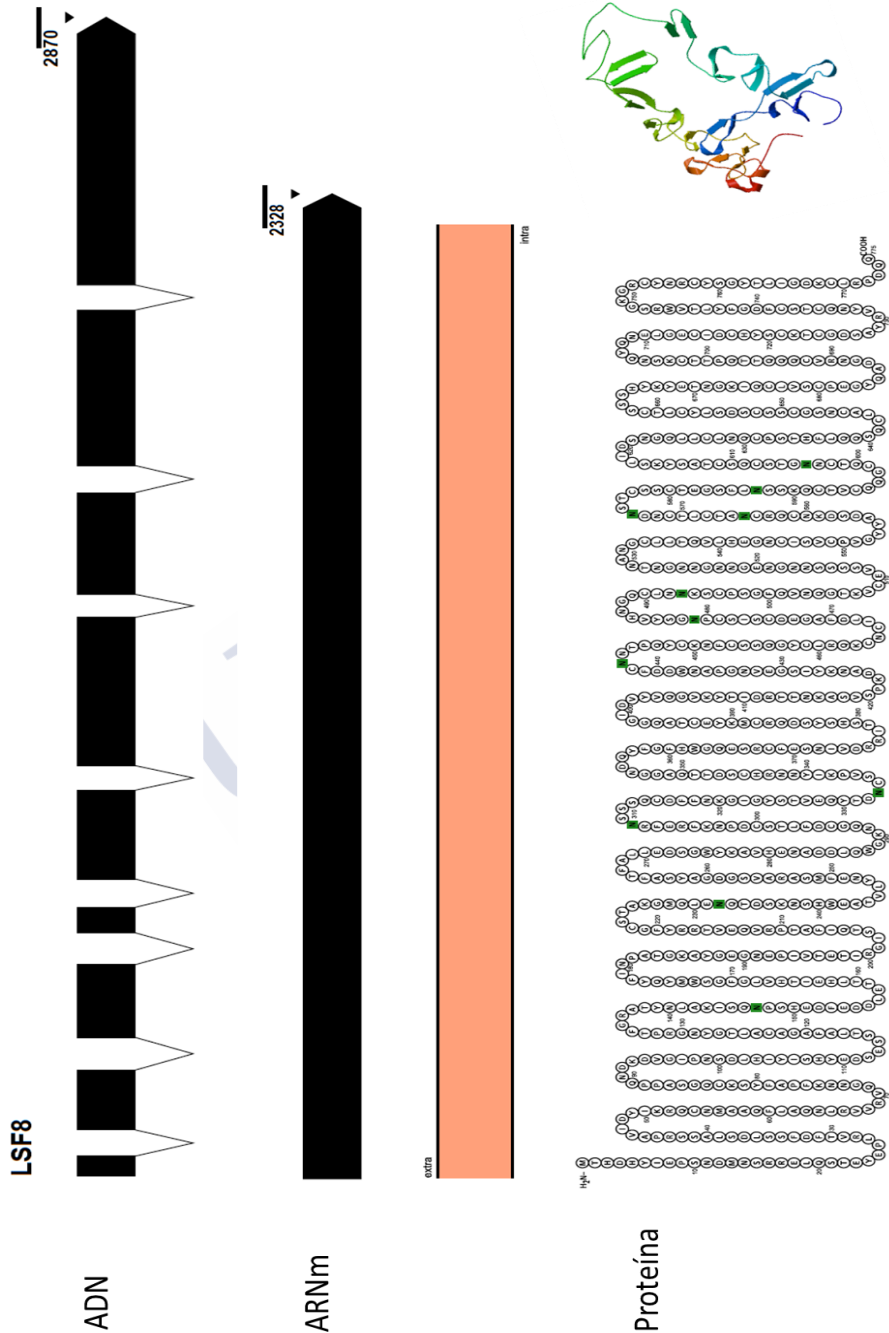
Proteína

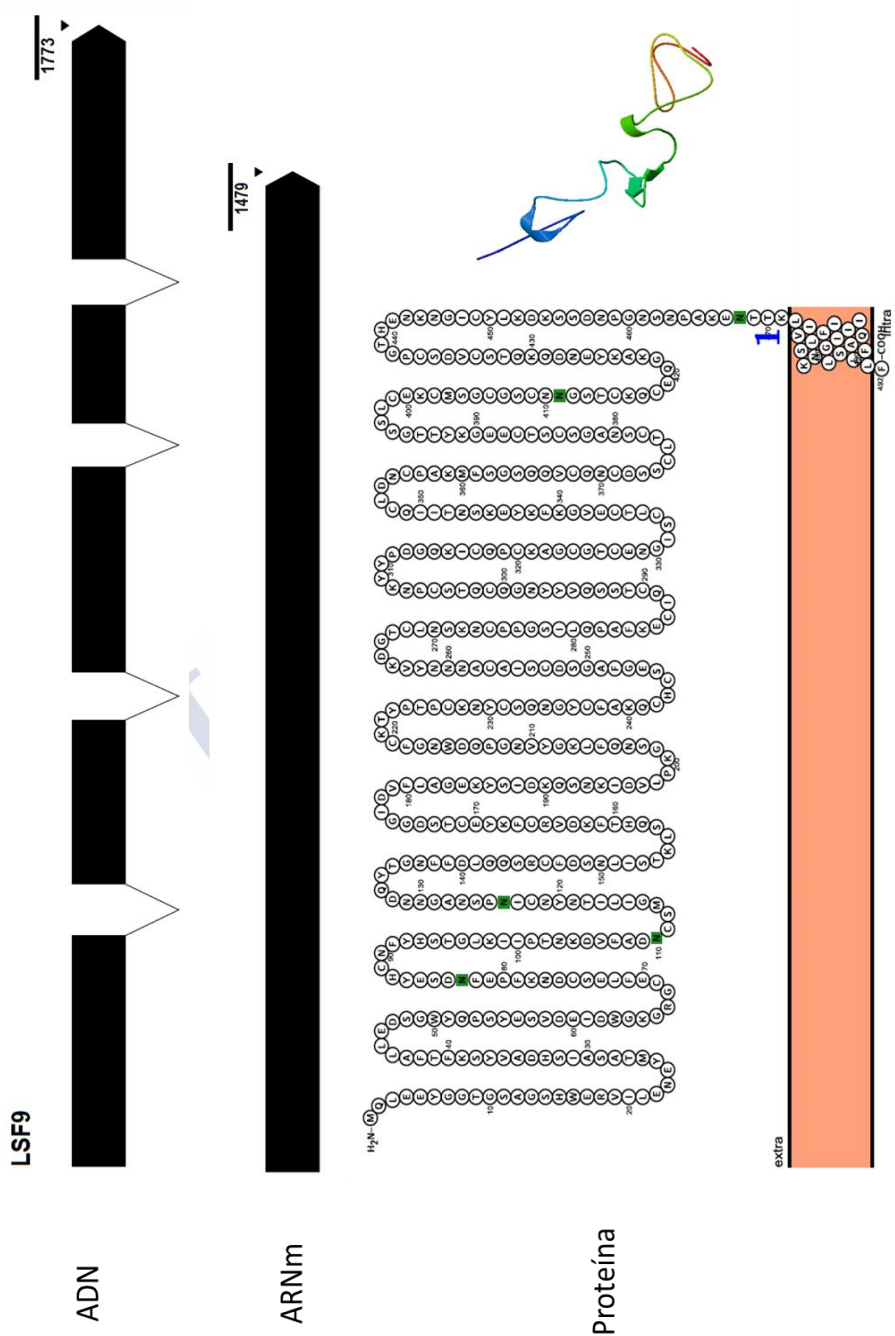


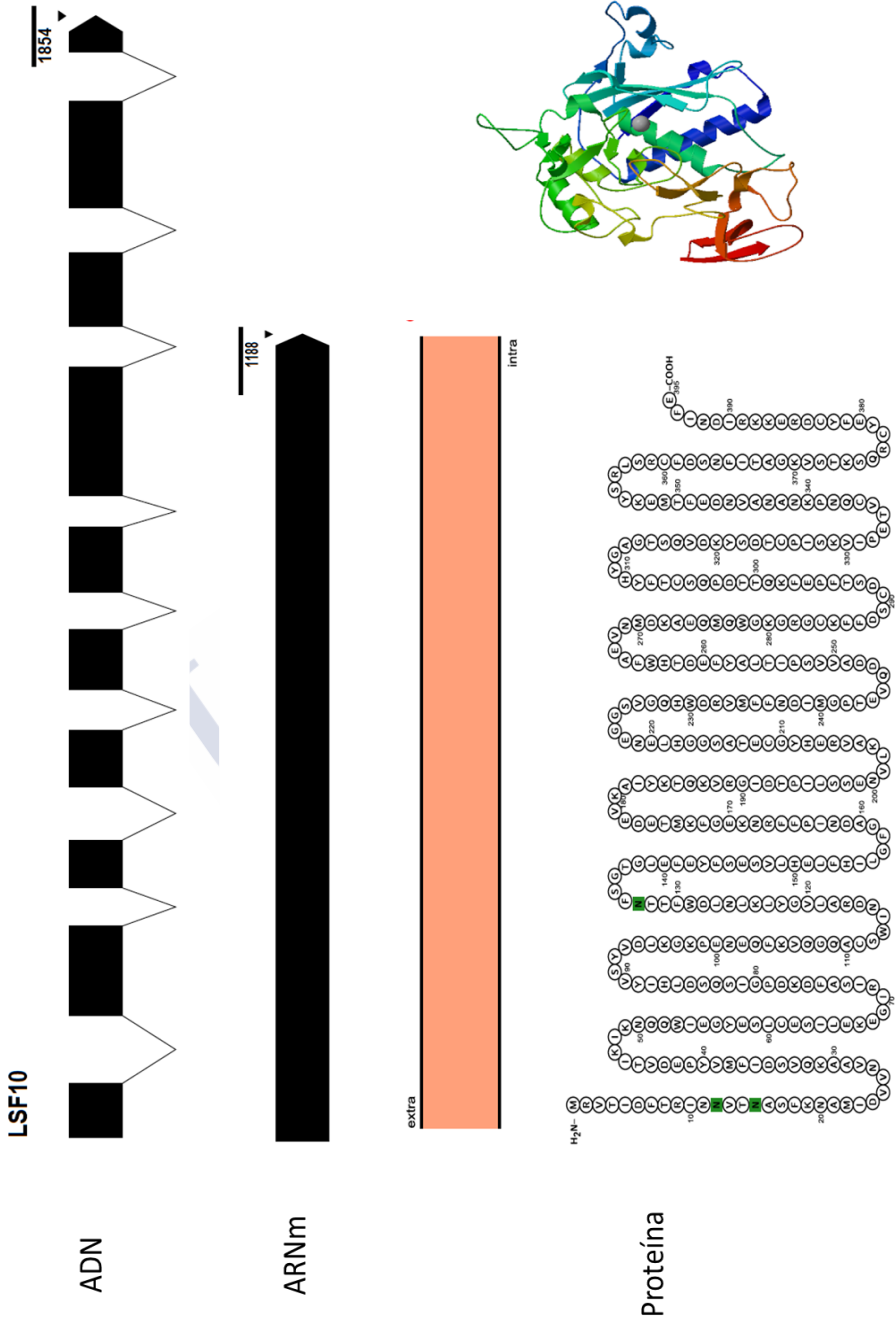


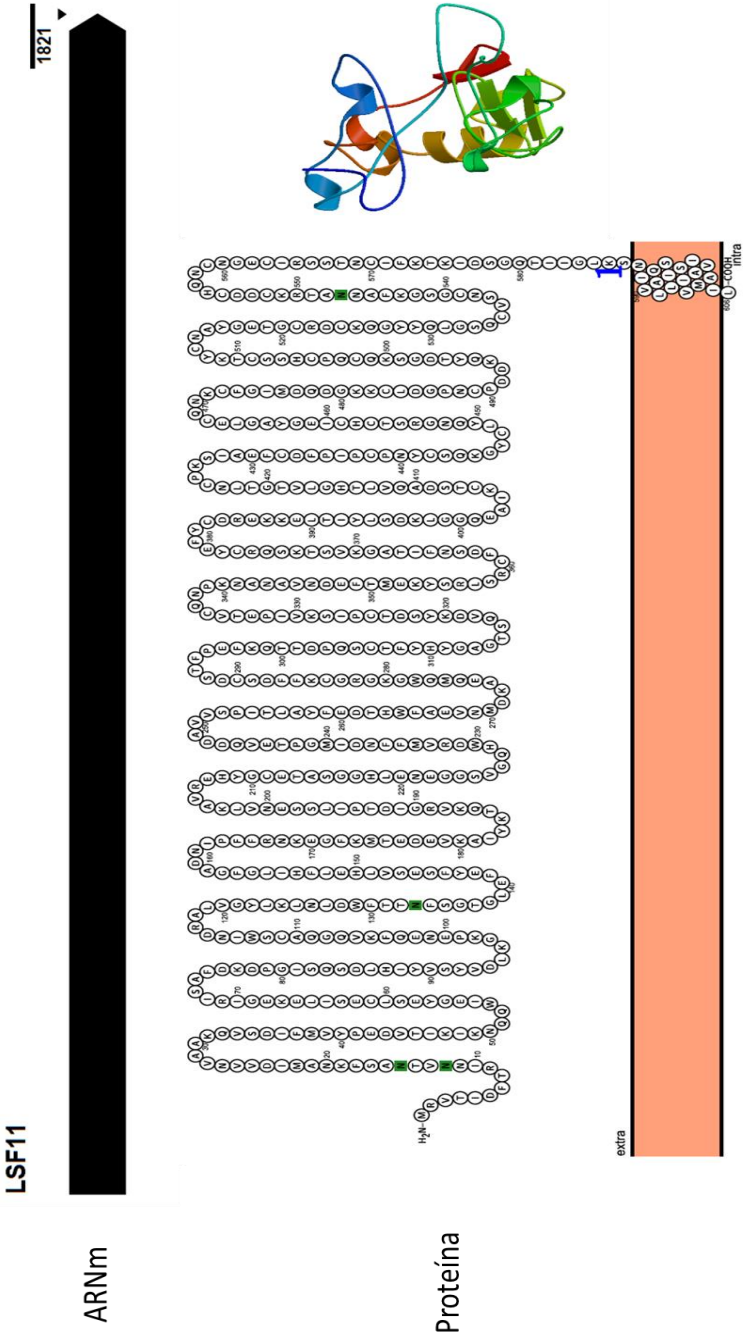


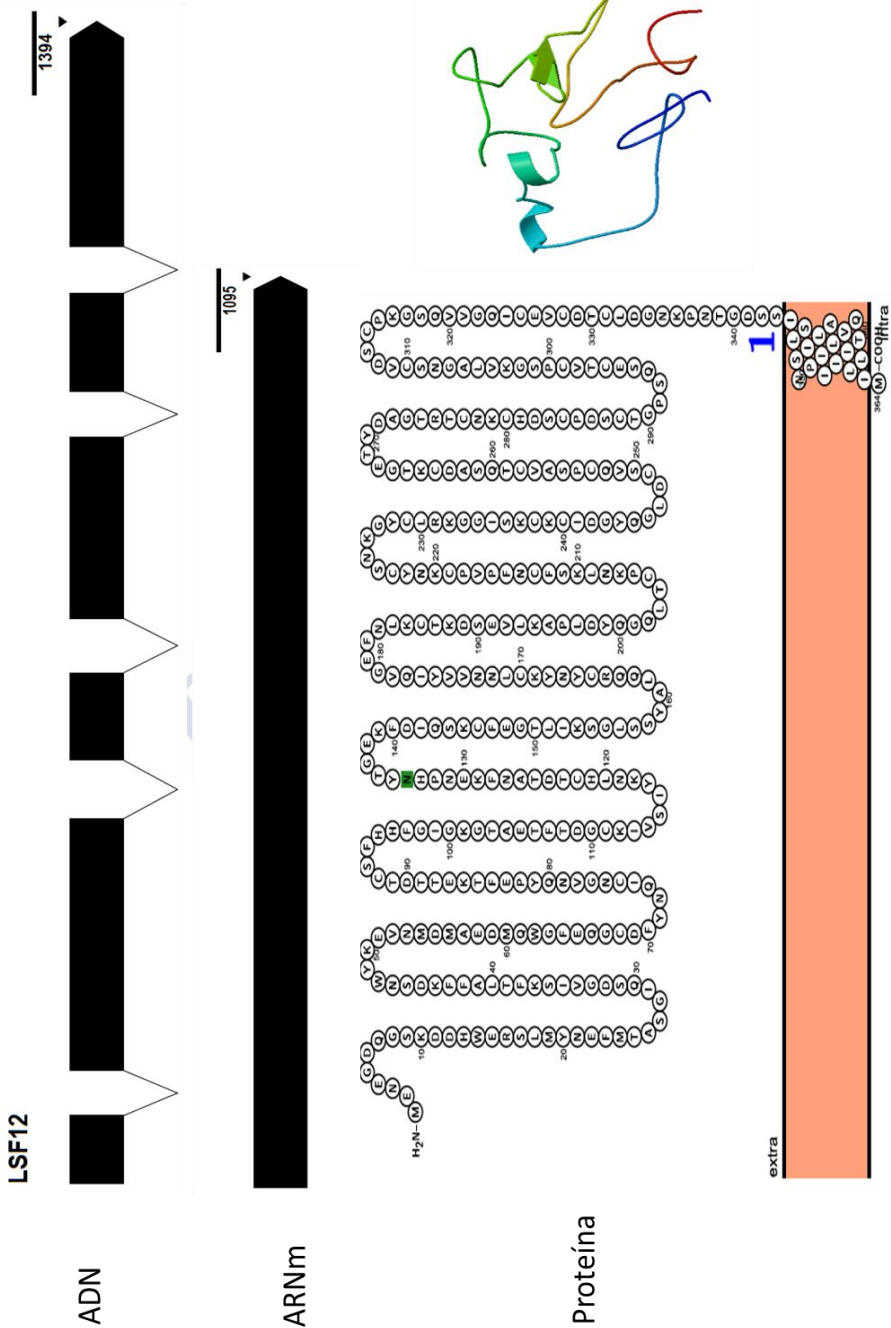


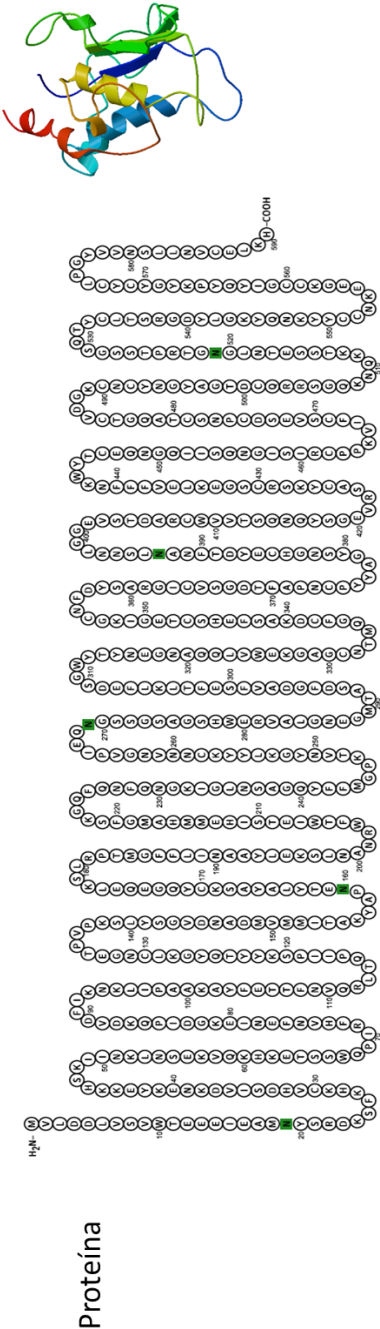
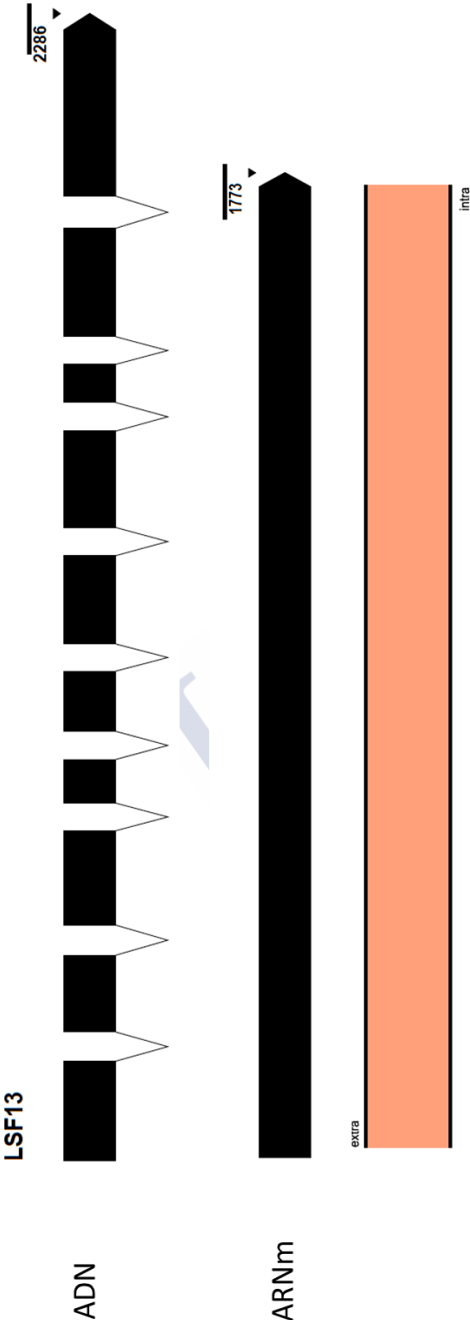


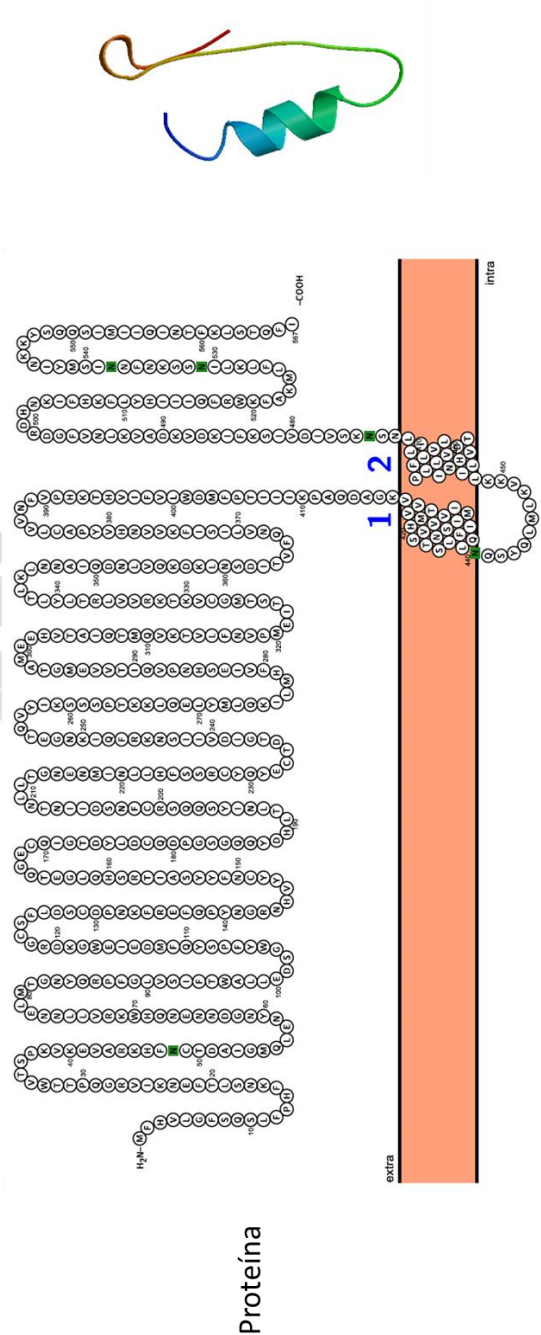
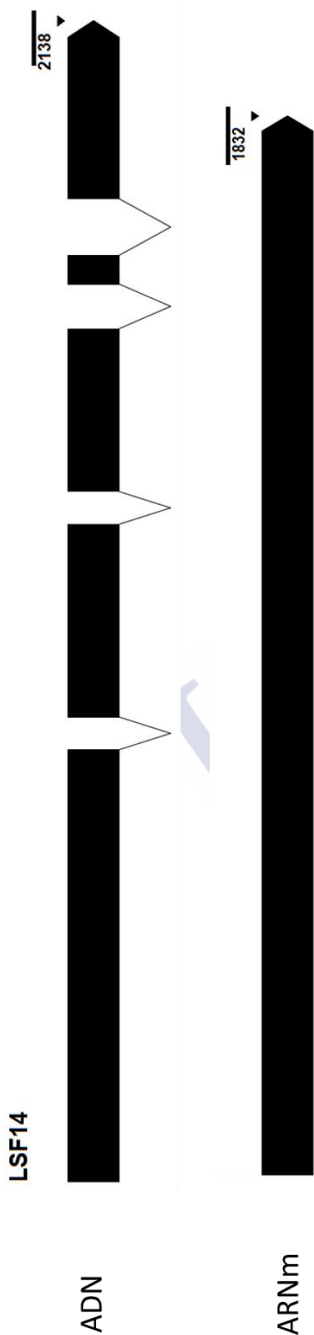


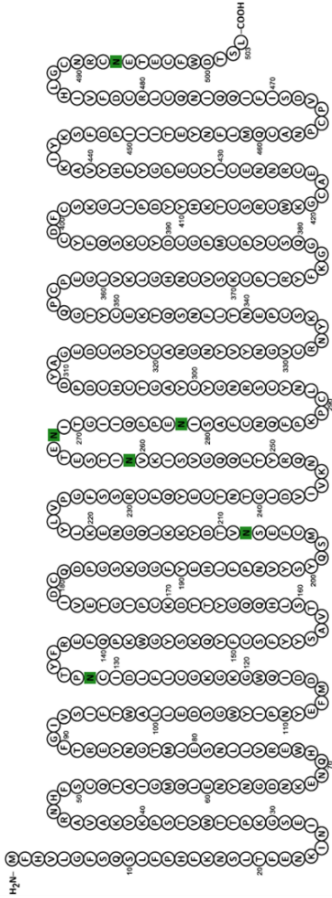
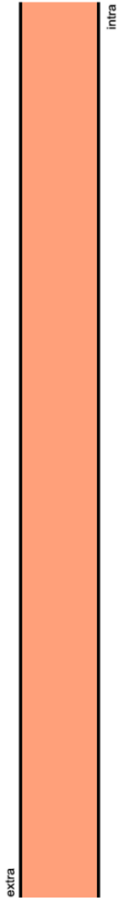
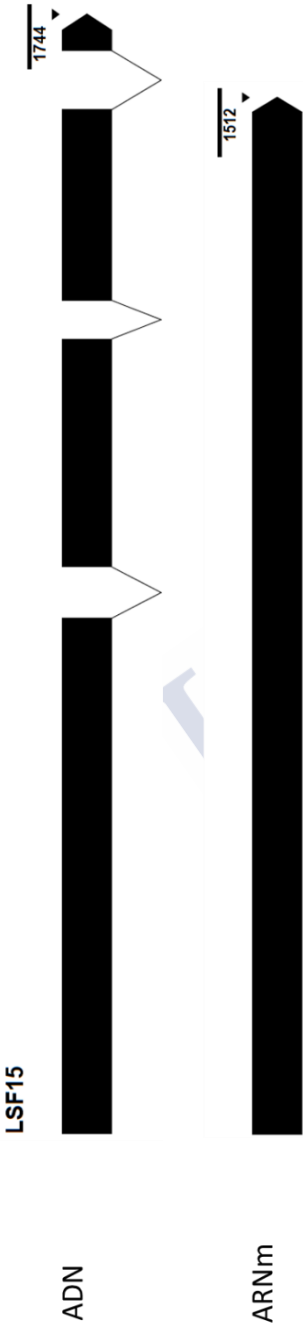


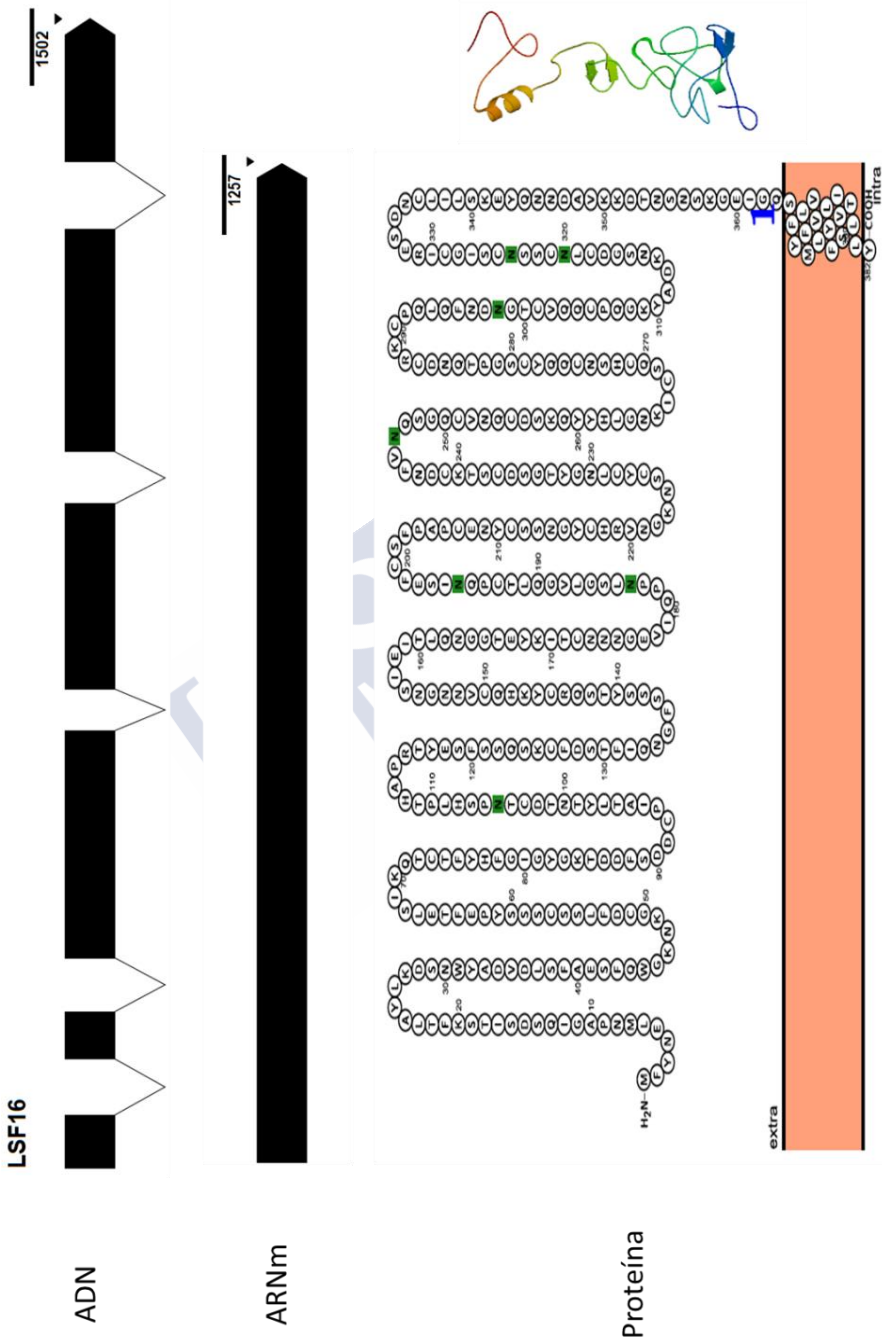


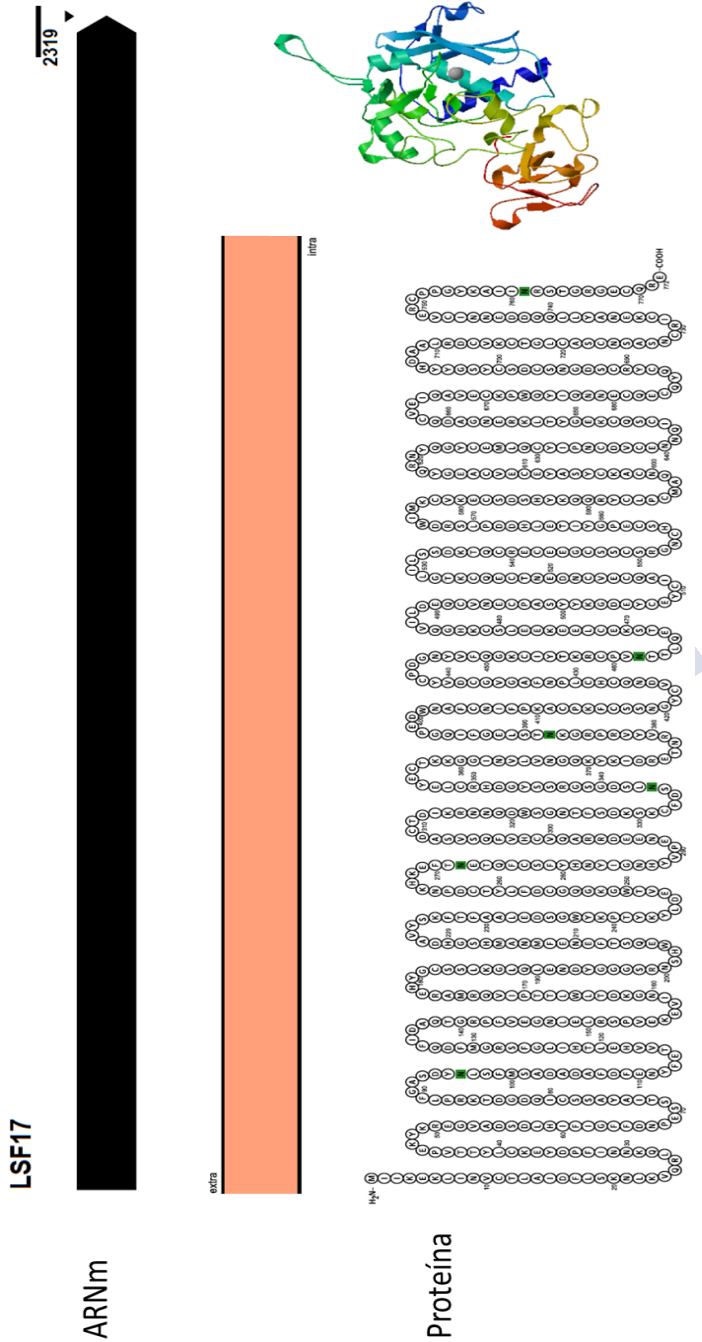












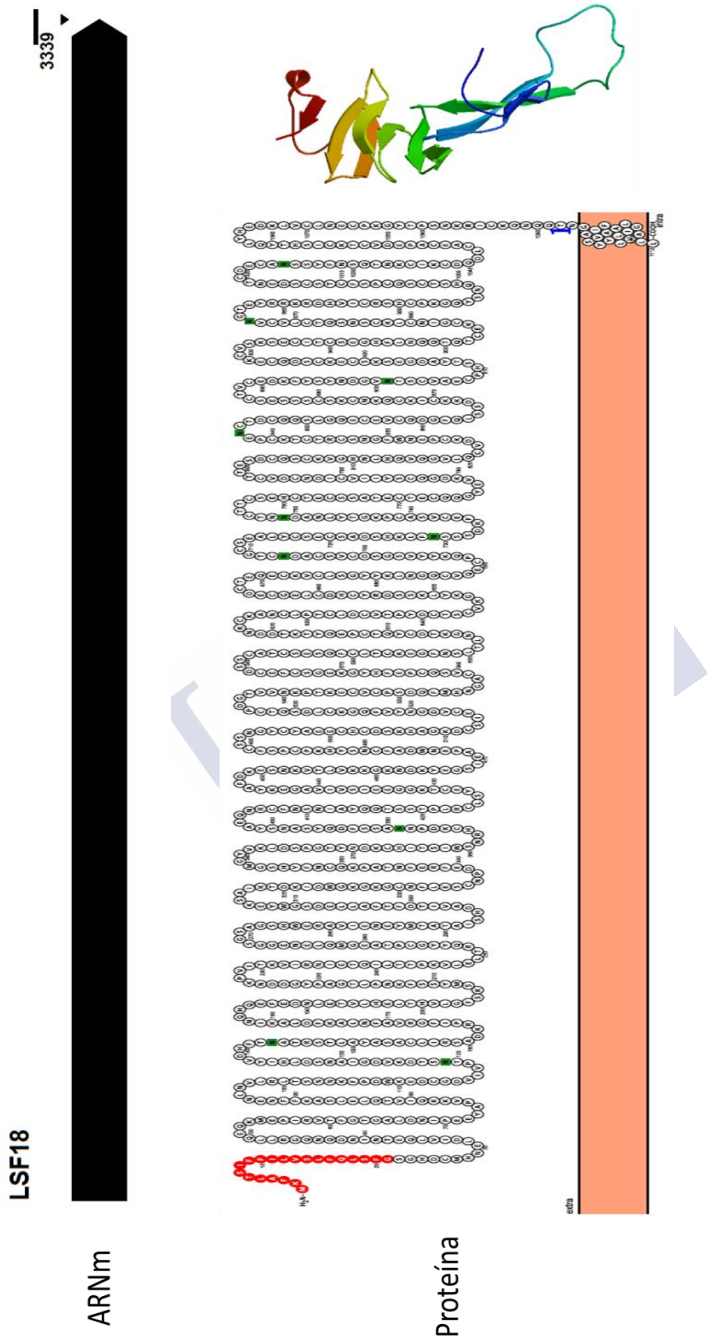


Fig. 11: Representación esquemática a escala de la presencia de exones (negro) e intrones (blanco) en la secuencias de ADN para distintos genes asociados a las leishmaniasis de la cepa 11 de *P. dicentrarchi* y modelos predictivos de la topología, estructura y localización dentro de la célula. En verde se indican los sitios de N-glicosilación, en rojo el péptido señal y numeradas en azul las regiones transmembrana.

6 de las proteínas que codificaban para algunos de esos genes presentaron una expresión diferencial en ciliados expuestos a una infección a distintos tiempos (1h, 2h y 4h dentro de la cavidad peritoneal del rodaballo). Como se observa en la tabla 5, transcurrida 1 hora tras la infección, el LSF13 es el único gen que se infraexpresa con respecto al control (ciliados procedentes de un cultivo). Este mismo gen se sobreexpresa a las 2 horas y se vuelve a infraexpresar a las 4 horas de infección. Otros genes que se expresan menos durante la infección que el control son LSF15 y LSF16; sin embargo, esto solo ocurre a las 2 horas de la infección. Los genes LSF12, LSF17 y LSF18 se sobreexpresan con respecto al control durante toda la infección, pero esta expresión varía durante el tiempo que los ciliados permanecen dentro de la cavidad peritoneal del rodaballo.

Tiempo dentro de la cavidad peritoneal del rodaballo	Nombre del gen	Log fold change
1 h	LSF18	13,0222215
	LSF17	6,66019971
	LSF12	4,63653377
	LSF15	2,78970774
	LSF13	-7,49960275
2 h	LSF13	56,7174342
	LSF18	15,9960053
	LSF12	6,39724179
	LSF17	5,93652415
	LSF15	-542524079
	LSF16	-19,3446574
4 h	LSF16	18.3.686.417
	LSF18	13.7957243
	LSF12	12.0971403
	LSF17	5.54326522
	LSF13	-29.9741977

Tabla 5: Expresión relativa para distintos genes que codifican para proteínas de la familia de las leishmanolisinas obtenidos de un análisis de RNA-seq utilizando como muestras ciliados de la cepa I1 de *P. dicentrarchi* inyectados dentro de la cavidad peritoneal de rodaballos y aislados a distintos tiempos. Los resultados se expresan

como valores de expresión (Log fold change) de las distintas muestras en comparación como ciliados control (ciliados procedentes de un cultivo).

Secuencias parciales de las 6 leishmanolisinas recogidas en la tabla 5 fueron ensambladas para generar un péptido quimérico, como se describe más adelante en el apartado 8.3.2.

6.5. DISCUSIÓN

La búsqueda de antígenos que produzcan una respuesta inmunitaria en el rodaballo y que generen protección es imprescindible a la hora de combatir las epizootias en las plantas de cultivo. Sin embargo, conocer estas proteínas llegando a localizarlas y caracterizarlas no resulta un trabajo sencillo, sobre todo si se tiene en cuenta que los patógenos experimentan modificaciones antigénicas que resultan de la modulación en la expresión de genes (Deitsch et al., 2009). Estas diferencias antigénicas se han observado entre distintas cepas, donde se ha visto que la protección depende del serotipo; es decir, no existe protección cruzada entre cepas (Dickerson y Findly; 2014). La variación antigénica también se ha descrito como un mecanismo de protección ya que algunos organismos son capaces de modificar los antígenos para evadir la respuesta del sistema inmunitario del hospedador (Deitsch et al., 2009). Sin embargo, en ciliados de vida libre, resulta más difícil entender cómo se cursa la variación antigénica. Si bien ciertos autores han descrito antígenos protectores que permitirían a estos protozoos pasar desapercibidos frente al reconocimiento de los depredadores, gracias a cambios en distintas proteínas, es probable que los ciliados sean capaces de variar sus antígenos de superficie con el fin de adaptarse a distintas condiciones, llegando a ser capaces de evadir la respuesta del sistema inmunitario del hospedador (Simon y Schmidt, 2007). En ensayos llevados a cabo con individuos de la especie *Philasterides dicentrarchi*, hemos visto que existen diferencias en el grado de virulencia tanto entre diferentes cepas, como entre ciliados procedentes de una infección o de largo tiempo en cultivo. Al infectar rodaballos con ciliados procedentes de una infección se alcanza una mortalidad del 100% a los 10 días tras la infección, tanto para la cepa I1 como C1. Sin embargo, cuando los

ciliados con los que se realiza la infección provienen de un cultivo de larga duración (pase 45), la mortalidad solo alcanza el 20%.

La variación antigénica se ha analizado a menudo mediante técnicas serológicas. En el caso de bacterias de la especie *Mycoplasma*, Yogev en 1994 detectó una proteína antigénica de membrana mediante el uso de anticuerpos séricos de pollos infectados con *M. gallisepticum*. En 1995, Rosengarten encontró esa misma proteína en otras dos especies de *Mycoplasma* patógenas de vacas; *M. imitans* y *M. iowae*. Y en 2008, Hamsten reconoció hasta 5 tipos distintos de proteínas variables de superficie de *Mycoplasma* que demostraron ser antigénicas para vacas mediante Western Blot. Estos resultados han permitido llegar a la conclusión de que bacterias de la especie *Mycoplasma* pueden expresar proteínas de superficie que experimentan cambios reversibles para modificar el conjunto de proteínas antigénicas a nivel celular y poblacional, como una adaptación para evadir la respuesta inmunitaria del huésped (Citti y Rosengarten, 1997; Razin et al., 1998). A la vista de estos resultados de mortalidad, analizamos el patrón de bandas en geles SDS-PAGE de ciliados de I1, C1 y B1. Al comparar las tres muestras vimos que los patrones de I1 y C1 compartían muchas bandas; sin embargo, B1 presenta distintas proteínas. Algunos autores sugieren que es necesaria la expresión de ciertas proteínas para que los ciliados se adapten al hospedador y que los ciliados pueden cambiar no solo antígenos de inmovilización superficiales, sino que también pueden modificar los principales epítomos de antígenos de superficie y disminuir la capacidad de matar del complemento mediado por anticuerpos (Lee y Kim., 2008; Lee et al., 2015).

Los antígenos de inmovilización o i-antígenos son proteínas de superficie que están ampliamente descritos en el protozoo *Ichthyophthirius multifiliis*. Se designan antígenos de inmovilización porque los anticuerpos generados frente a estos antígenos son capaces de inmovilizar a los ciliados en ensayos *in vitro*. Estos antígenos han sido purificados tradicionalmente mediante cromatografía de afinidad acoplando a la matriz de la columna un anticuerpo monoclonal generado frente al parásito; obteniéndose así todas aquellas proteínas del patógeno que resultan antigénicas (Wang y Dickerson, 2002). Wang

et al., vieron en 2002 que los i-antígenos de dos cepas diferentes de *I. multifiliis*, las cuales presentaban diverso grado de virulencia, eran distintos. Esta conclusión la obtuvieron al ver que, al llevar a cabo ensayos de protección cruzada con ambas cepas, la protección era dependiente del serotipo. Esto implica que si se quiere obtener protección frente a una determinada cepa se debe de vacunar con esa cepa, pero si lo que se quiere es diseñar una vacuna universal que permita generar una protección frente a varias cepas es importante caracterizar que antígenos se expresan de forma diferencial entre las mismas; así como bajo distintas condiciones, y formular una vacuna que contenga estos antígenos. En nuestro caso, la purificación del antígeno Fab2 nos ha permitido aislar aquellas proteínas del ciliado que resultan antigénicas para el rodaballo.

En parásitos, como *Paramecium*, la variación antigénica generalmente se ha analizado a través de ensayos de inmovilización, donde la aglutinación es inducida por la interacción de anticuerpos con antígenos de superficie (Hansma, 1975; Barnett y Steers, 1984). Este tipo de ensayos también se han llevado a cabo en *P. dicentrarchi* y se ha observado que los ciliados procedentes de una infección del pez plano *Paralichthys olivaceus* sí que aglutinaban al incubarlos con el suero inmune del pez; sin embargo, los ciliados procedentes de cultivo no generaban aglutinación sugiriendo que los *P. dicentrarchi* infectados en *Paralichthys olivaceus* expresan algún antígeno de inmovilización de superficie diferente al expresado en las condiciones de cultivo. En nuestro caso, el suero de rodaballo inmune generado frente a la cepa I1 no aglutinó a los ciliados de la cepa B1 de *P. dicentrarchi* pero si aglutinó a una dilución 1:200 al 100% de los ciliados de las cepas I1 y C1 en 2 horas. Sin embargo, al incubar el SIR con antígeno Fab2 y llevar a cabo el ensayo de aglutinación, esta fue inhibida por el antígeno, el cual es capaz de bloquear los anticuerpos, por lo que este antígeno está formado por proteínas que están presentes tanto en I1 como en C1 y que resultan antigénicas para el pez. Algunos autores han hallado una relación entre el grado de virulencia y la variación antigénica (Wang et al., 2002; Swennes et al., 2006),

Con la intención de identificar las proteínas que conforman el antígeno Fab2, se llevó a cabo un Western Blot y se seleccionó la banda del antígeno Fab2 correspondiente a 38 kDa, la cual fue reconocida por el SIR. Con el análisis proteómico de esta banda se obtuvieron un total de 12 proteínas, una de las cuales era una proteína variable de superficie (VSP3.0).

Muchos autores han recurrido al análisis de la expresión diferencial de genes entre muestras para la búsqueda de antígenos (Lee et al., 2011; Mo et al., 2016). En nuestro caso, gracias a los resultados del análisis de hibridación sustractiva por supresión (entre aislados de distintos pases de la cepa I1) y RNA-seq (entre ciliados de la cepa I1 y B1) obtuvimos dos secuencias de proteínas de la familia de las VSPs (VSP1.0 y VSP2.0, respectivamente) las cuales se expresaban de manera diferencial entre muestras.

Viendo que había diferencias en la expresión en proteínas de la familia de las VSPs en aislados que presentaban diferente grado de virulencia y que éstas estaban presentes en una fracción antigénica del ciliado, intentamos llevar a cabo una mejor caracterización de estas proteínas en las cepas I1, C1 y B1 de *P. dicentrarchi*. Para ello, y partiendo de la secuencia completa de la VSP2.0, se siguieron distintas estrategias. Por un lado, se sintetizó una proteína recombinante, r-VSP2, a partir de la cual se obtuvo un anticuerpo, anti-r-VSP2. Esto nos permitió inmunolocalizar la proteína en la parte externa del ciliado (mediante el ensayo de inmunofluorescencia) y ver como se modula la expresión de las distintas proteínas VSPs en función de las condiciones de cultivo (mediante ELISA y Western Blot sobre geles 2-DE). Por otro lado, se sintetizaron unos cebadores que permitieron amplificar y, posteriormente, secuenciar distintas VSPs presentes en diferentes condiciones de cultivo (pases). Como todas las proteínas de la familia tienen zonas comunes es probable que, aunque los ratones se hayan inmunizado con la proteína recombinante r-VSP2, el suero anti-r-VSP2 marque también otras VSPs. Por ello, como se aprecia en los Western Blots correspondiente a las electroforesis 2-DE, el anticuerpo marca distintas poblaciones de proteínas con distinta intensidad. En cuanto a valores cuantitativos, el ELISA revela que existen diferencias

significativas en la expresión de las VSPs entre ciliados de pase 0 y ciliados de distintos pases, reduciéndose dichas diferencias cuando los ciliados de largo tiempo en cultivo (p45) se incuban con suero inmune de rodaballo.

A partir de la secuenciación se obtuvieron un total de 5 VSPs, los cuales aparecieron en distinta proporción en función del pase o el aislado. Al provenir de una infección, los ciliados presentan una mayor variedad en la expresión de proteínas de la familia VSP, cuando se pasan a cultivo expresan mayormente uno (VSP3.0) y cuando están adaptados a las condiciones de cultivo expresan otro (VSP4.0); sin embargo, esta expresión cambia cuando estos ciliados de largo tiempo en cultivo se incuban con suero inmune de rodaballo para las cepas I1 y C1. Para la cepa B1 no se observaron cambios ya que los ciliados solo expresan VSP4.0, tanto si han estado en contacto como si no con el SIR. En 2002, Nash ya describió variaciones en la expresión de las VSPs en función de las condiciones de cultivo en *Giardia lamblia*. Esto se puede deber a que, al entrar en contacto con componentes del pez, los ciliados cambian la expresión de distintos antígenos protectores (con respecto a las condiciones de cultivo) como mecanismo de evasión a las defensas inmunitarias del hospedador (Piazzon et al., 2008; Budiño et al., 2011).

De las 7 proteínas distintas de la familia VSP localizadas en *P. dicentrarchi*, 3 secuencias están completas (VSP1.0, VSP2.0 y VSP3.0). Estas presentan pesos moleculares cercanos a 28 kDa, con puntos isoeléctricos teóricos que van desde 5.17 a 7.17. Una característica bioquímica importante es el porcentaje de cisteínas. Las 3 secuencias presentan alrededor de un 10% de cisteínas lo que significa que es el tercer aminoácido que más se repite en la secuencia proteica. Esta periodicidad de los residuos de cisteína es una característica de las proteínas antigénicas de superficie (Xu et al., 2009). Estas repeticiones aparecen en antígenos de superficie de otros protozoos como *Tetrahymena* spp. (Doerder y Gerber, 2000) por lo que dicha estructura periódica parece estar conservada en los antígenos de superficie de los organismos protistas en general (Simon y Schmidt, 2007), además de estar también relacionada con las proteínas variables de superficie (VSPs) de *Giardia lamblia* (Chen et al., 1995; Nash et al., 2002). Por

otro lado, se trata de proteínas muy glicosiladas, además de contener péptido señal y regiones de transmembrana; características que comparten con VSPs descritas en otras especies (Prucca y Lujan, 2009). Además, el análisis filogenético permitió establecer una relación entre las secuencias de VSPs de *Philasterides dicentrarchi* con las identificadas en individuos del género *Giardia* y *Plasmodium*, donde han sido descritas como antígenos que han generado altos niveles de protección en ensayos de vacunación (Mello et al., 2004; Rivero et al., 2010).

Por todo ello, es lógico pensar que a la hora de inmunizar debemos de utilizar antígenos que generen respuesta frente a todas estas proteínas que el ciliado es capaz de modular en función de las condiciones. Algunos autores han sugerido el uso de vacunas a partir de recombinantes de proteínas variables de superficie, lo que supondría una mejora en comparación con el uso de vacunas vivas atenuadas, ya que se reducirían los efectos secundarios indeseables debido a que se trataría de una vacuna mucho más específica que solo generaría anticuerpos frente a aquellas proteínas realmente antigénicas (Hamsten, 2008). En nuestro caso, la síntesis de la proteína recombinante VSP2 nos ha permitido realizar una caracterización preliminar e inmunolocalizar esta proteína en la membrana del ciliado. Sin embargo, y una vez visto que en *P. dicentrarchi* se pueden expresar hasta un mínimo de 7 proteínas distintas para las VSPs que le permiten evadirse del sistema inmunitario del pez, para generar una vacuna que resulte eficaz y que pueda generar protección, hemos diseñado un péptido quimérico que contengan la parte más antigénica de cada una de estas 7 proteínas, como se describe más adelante en el capítulo 8.

En el caso de la leishmanolisinas, a pesar de que varios autores han relacionado estas proteínas con la capacidad parasitocida en protozoos (Cassidy-Hanley et al., 2011; Acorn et al., 2011) todavía no se han llevado a cabo estudios de protección utilizando esta familia de proteínas como antígenos. Los resultados obtenidos a partir del RNA-seq sugieren que *P. dicentrarchi* es capaz de modular distintas leishmanolisinas durante la infección, al igual que se ha descrito en otros ciliados (Seo et al., 2013). Por ello, y de igual manera que con las

VSPs, se diseñó un péptido quimérico que contiene la parte más antigénica de 6 proteínas de la familia de las leishmanolisinas (como se describe más adelante en el capítulo 8), el cual también fue utilizado como antígeno en ensayos de vacunación y protección.



Capítulo 7

ADYUVANTE DE HIDROGEL DE QUITOSANO

7.1. RESUMEN

A la hora de diseñar una vacuna es importante que esta sea eficaz; es decir, que genere una buena respuesta y que sea lo más inocua posible (que no tenga efectos secundarios adversos sobre el pez). Por ello, resulta especialmente importante la elección del adyuvante. Los adyuvantes de naturaleza oleosa generan una buena respuesta, pero causan daños en la cavidad peritoneal de los animales. El quitosano es un polímero natural, derivado de la quitina, que ha sido probado en distintos organismos como adyuvante. En el presente estudio se llevaron a cabo ensayos en ratón que nos permitieron evaluar los niveles de anticuerpos y analizar el tipo de respuesta que induce el adyuvante hidrogel de quitosano en comparación con el adyuvante completo de Freund mediante ensayos serológicos y de expresión genética. También se inmunizaron rodaballos utilizando como adyuvantes Montanide ISA 763 A VG e hidrogel de quitosano para realizar un estudio comparado, a partir del cual se vio que ambos adyuvantes desencadenan una buena respuesta a nivel de anticuerpos; sin embargo, el quitosano genera menos daños aparentes en los peces inmunizados. En base a estos resultados, creemos que el hidrogel de quitosano podría ser un buen candidato para su uso como adyuvante en vacunas de peces.

7.2. INTRODUCCIÓN

Los adyuvantes se han definido como agentes agregados a las formulaciones de vacunas que mejoran la inmunogenicidad de los antígenos e inducen la protección contra la infección. Por lo tanto, los adyuvantes son sustancias inmunopotenciadoras; es decir, ayudan a la formación de una respuesta inmunitaria de mayor intensidad, mayor duración, más rápida y con una menor cantidad de antígeno, lo que

reduce los costes en la producción de vacunas (Chang et al., 2010). Se han propuesto varios mecanismos para explicar la eficacia de los adyuvantes y cómo pueden mejorar la respuesta de la vacuna. Los adyuvantes pueden inducir inflamación local al aumentar el contacto del antígeno con células migratorias y forman un depósito de antígeno liberándolo lentamente, prolongando así la interacción con los macrófagos. Los adyuvantes pueden aumentar la velocidad y la duración de la respuesta inmunitaria. Además, pueden modular la avidez, especificidad, isotipo, distribución de subclases de anticuerpos, estimular la inmunidad mediada por células; inducir la inmunidad de la mucosa y aumentar la respuesta inmunitaria en individuos inmunológicamente inmaduros (Carroll et al., 2016).

El adyuvante más apropiado para cada vacuna depende, en gran medida, del tipo de respuesta inmunitaria requerida para generar protección, ya que diferentes adyuvantes pueden estimular diferentes respuestas inmunitarias (Morais et al., 2018). Se han probado diferentes formulaciones que han presentado un alto potencial adyuvante, pudiendo estar formados por sustancias sintéticas o naturales. Los polímeros naturales disponibles para la producción de nanopartículas incluyen albúmina, colágeno, quitosano, dextrano; entre otros. Los ejemplos de polímeros sintéticos incluyen poliésteres, polianhídridos y oliamidas (Carroll et al., 2016). Además, los componentes bacterianos a menudo se prueban como activadores del sistema inmunológico; por ejemplo, ADN bacteriano con motivos inmunoestimulantes (Li et al., 2013).

Los adyuvantes deben ser estables, biodegradables, de bajo costo de producción y promover una respuesta inmunitaria e inflamatoria adecuada. Un obstáculo importante es la falta de adyuvantes que puedan conducir de manera segura una potente inmunidad celular contra patógenos intracelulares. El quitosano es un polisacárido derivado de la desacetilación parcial de la quitina, que se encuentra principalmente en cáscaras de crustáceos e insectos, así como de las paredes celulares de algunas bacterias y hongos (Senel y McClure, 2004). Consiste en la repetición de unidades de glucosamina y n-acetilglucosamina, cuyas proporciones determinan el grado de desacetilación del polímero. Con

un pKa de aproximadamente 6,5 en los grupos amino, el quitosano es insoluble a pH neutro y alcalino, pero forma sales solubles en agua con ácidos orgánicos e inorgánicos (ácido glutámico, ácido clorhídrico, ácido láctico y ácido acético). Tras la disolución en medio ácido, los grupos amino del polímero se protonan, haciendo que la molécula quede cargada positivamente. Al afectar el número de grupos amino protonables, el grado de desacetilación determina fundamentalmente las propiedades del polímero, incluidas la solubilidad, la hidrofobicidad y la capacidad de interactuar electrostáticamente con polianiones. En cuanto al peso molecular (el cual oscila entre los 3800 y 2000000 Daltons), en general, los quitosanos que tienen pesos moleculares y grados de desacetilación más bajos presentan mayor solubilidad y una degradación más rápida que los de alto peso molecular. Además, el grado de viscosidad del quitosano es alto debido a una estructura lineal no ramificada, el cual aumenta a medida que se incrementa su alto peso molecular (Li et al., 2013). En cuanto a sus características biológicas, la biodegradación del quitosano da lugar a la liberación de amino azúcares que pueden ser incorporados en forma de glicosaminoglicanos a rutas metabólicas de eliminación de estos compuestos (Bowman y Leong, 2006).

La quitina es fácil de obtener, ya que es el segundo polímero natural más abundante, después de la celulosa. Por ello, los quitosanos se aplican de manera muy amplia (industria química, biotecnología, agricultura, veterinaria, odontología, procesamiento de alimentos, protección del medio ambiente, medicina, etc.) y existe una gran variedad de productos de quitosano que difieren en su bioquímica y características físicas (Senel y McClure, 2004; Li et al., 2013; Riteau y Sher, 2016). En comparación con otros polisacáridos naturales, el quitosano tiene una alta biodegradabilidad, baja toxicidad y no es irritante ni alérgico en los seres humanos (Seferian y Martínez, 2001).

El polisacárido quitosano es capaz de inducir una potente inmunidad mediada por células a través de la maduración de células dendríticas. También, se ha visto que el quitosano puede activar los macrófagos y las células asesinas naturales (*natural killer*, *NK*) (Li et al., 2013). Se cree que el aumento a nivel de protección por parte de las

nanopartículas de quitosano puede deberse a que inducen la liberación de citoquinas, cambiando el equilibrio Th1/Th2 y activando los macrófagos y las células NK, combinado con un aumento de la absorción del antígeno (Wen et al., 2011). En estudios realizados en ratones, se ha demostrado que el quitosano mejora las respuestas inmunitarias humorales y mediadas por células en comparación con vacunas que contiene adyuvante de Freund o hidróxido de aluminio (Chang et al., 2010; Carroll et al., 2016).

Las proteínas recombinantes tienen potencial como antígenos de vacunas, pero a menudo son débilmente inmunogénicas y la inmunización con estas proteínas puede no provocar una respuesta inmunitaria significativa que reconozca la proteína nativa. Por lo tanto, se requiere un adyuvante para potenciar la respuesta inmunitaria del antígeno administrado. Sin embargo, la actividad adyuvante fuerte a menudo se correlaciona con una mayor toxicidad y efectos adversos. El adyuvante completo de Freund (FCA) se encuentra entre los adyuvantes conocidos más potentes y un buen estimulante tanto a nivel celular como humoral; sin embargo, el FCA causa reacciones severas y es demasiado tóxico (Seferian y Martínez, 2001; Morais et al., 2018).

El quitosano se ha utilizado como adyuvante para la inmunización de peces (Zhang et al., 2019; Zhu et al., 2019). Se han obtenido altos niveles de protección usando este adyuvante en combinación tanto con organismos inactivados con formalina como con antígeno particulado (León-Rodríguez et al., 2012; Liu et al., 2015). En el caso del rodaballo, se ha visto que la inmunización con microesferas de quitosano que contenían el antígeno unido covalentemente indujo la activación de genes involucrados en la adhesión celular y el citoesqueleto de actina, la regulación de señales pro y anti-apoptóticas, una disminución en la expresión de genes relacionados con la migración y la actividad de los linfocitos y un aumento en la expresión de varios genes implicados en la respuesta inflamatoria. Además, el uso de quitosano como adyuvante generó menos adherencias en la cavidad peritoneal, en comparación con otros adyuvantes oleosos; donde se observó un menor crecimiento de los peces (León-Rodríguez et al. 2012; 2013; Noia et al., 2014; Fontenla et al., 2016).

A continuación, se detallan algunos ensayos llevados a cabo que nos han permitido analizar de manera preliminar como actúa y los efectos que generan las vacunas, tanto en ratones como en rodaballos, que contienen como adyuvante hidrogel de quitosano.

7.3. MATERIALES Y MÉTODOS

7.3.1. Preparación del adyuvante de hidrogel de quitosano

Para la preparación del hidrogel de quitosano se disolvió 1 g de quitosano en 100 mL de una solución acuosa de ácido acético al 2%. A continuación, se añadió trifosfato de sodio al 10% y se mantuvo la solución a 40 °C durante 1h con un pH constante de 5.5. Posteriormente, se añadió acetona hasta que el hidrogel precipitó. Por último, se lavó repetidamente el hidrogel con agua destilada mediante centrifugación y se dejó secar en una estufa a 40 °C durante 24h. Una vez que el gel estuvo completamente seco, se pulverizó, se ajustó con agua destilada a una concentración de 10 mg/mL para su uso y se almacenó a 4 °C con timerosal al 0,01% para su conservación.

7.3.2. Características físicoquímicas del adyuvante de hidrogel de quitosano

7.3.2.1. Microscopía óptica y microscopía de fluorescencia

Una muestra del hidrogel de quitosano fue visualizada al microscopio óptico para observar su estructura a nivel microscópico. Además, se realizaron microfotografías al microscopio de fluorescencia ya que el quitosano presenta autofluorescencia.

7.3.2.2. Cálculo del porcentaje de absorción

10 mg/ml de hidrogel de quitosano se incubaron con seroalbúmina bovina (1 mg/mL) en agitación. A distintos tiempos (0, 15, 30, 60 y 120 minutos) la muestra se centrifugó a 12000 x g 10 minutos y se midió la cantidad de proteína del sobrenadante en un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, EE.UU.).

7.3.3. Estudio de la respuesta tras la inmunización. Estudio comparativo entre el adyuvante de hidrogel de quitosano y un adyuvante oleoso en ratón

7.3.3.1. Inmunización de ratones con adyuvante de hidrogel de quitosano y adyuvante de Freund

Para la inmunización de los ratones (5 por grupo) y para la obtención del suero se siguió el protocolo descrito en el apartado 4.3.6.1., utilizando como adyuvantes hidrogel de quitosano a una concentración de 10 mg/ml o adyuvante completo de Freund 1:1 (v/v). Como antígeno se utilizaron dos proteínas recombinantes: VSP2, muy glicosilada, y FeSOD, poco glicosilada (ver como se sintetizaron estas proteínas en los capítulos 6 y 2, respectivamente). Como controles también se inmunizaron ratones solo con adyuvante de Freund, solo con adyuvante de quitosano, con PBS y con PBS y antígeno. Para el análisis de los niveles de anticuerpos, se obtuvo el suero a los 30 días tras la primera inmunización, como se describe anteriormente. Para el ensayo de expresión génica, a los 3 días después de la inmunización, se lavó la cavidad peritoneal con medio L-15 incompleto y se obtuvieron las células peritoneales mediante centrifugación a 2500 x g 10 minutos.

7.3.3.2. Determinación de los niveles de inmunoglobulinas de ratón en el suero mediante ELISA

Para evaluar los niveles de anticuerpos específicos se llevó a cabo un ELISA indirecto (apartado 4.3.7.1.1.). En este caso se tapizaron las placas con la proteína recombinante correspondiente y el anticuerpo primario de ratón se utilizó a una dilución 1:500. A continuación, los pocillos se lavaron y se incubaron con suero de cabra anti-IgG1, anti-IgG2a y anti-IgG de ratón (Santa Cruz Biotechnology), respectivamente, a una dilución 1:2000. Tras los correspondientes lavados, los pocillos se incubaron con un anticuerpo de conejo anti-cabra conjugado con peroxidasa (Dakopatss, EEUU) (1:10000 en TBST-0,2%). Finalmente, se llevó a cabo el revelado y la medición de la absorbancia.

Como controles se utilizaron sueros pre-inmunes.

7.3.3.3. Análisis de los niveles de expresión de genes asociados a respuestas tipo Th1, Th2 y Th17

La síntesis de ADNc a partir de ARN y la qPCR se cursó como se describe anteriormente (apartado 4.3.7.2.). En este caso las muestras analizadas fueron células peritoneales de ratón inmunizados con PBS, quitosano, FCA/FIA, PBS y antígeno, quitosano y antígeno, FCA/FIA y antígeno. Los cebadores utilizados para analizar la expresión de los genes fueron (FmIFN γ / RmIFN γ) 5'-ACTGGCAAAGGATGGTGAC - 3' / 5' - TGAGCTCATTGAATGCTTGG - 3' para el Interferon gamma (IFN γ), (FIL-4 / RIL-4) 5'-TCAACCCCCAGCTAGTTGTC -3' / 5'-TGTTCTTCGTTGCTGTGAGG -3' para la Interleucina 4 (IL-4) y (FmTGFB1 / RmTGFB1) 5'- TTGCTTCAGCTCCACAGAGA - 3' / 5' - TGGTGTAGAGGGCAAGGAC - 3' para el *Transforming growth factor β 1*. Como gen de referencia se utilizó la beta actina (Fmbactin / Rmbactin) 5' - AGCCATGTACGTAGCCATCC - 3' / 5' - CTCTCAGCTGTGGTGGTGAA - 3'.

7.3.4. Estudio de la respuesta tras la inmunización. Estudio comparativo entre el adyuvante de hidrogel de quitosano y un adyuvante oleoso en rodaballo

7.3.4.1. Inmunización de los rodaballos

Los rodaballos se inmunizaron mediante inyección intraperitoneal (i.p.) en los días 0 y 30 con 200 μ l (por pez) de una emulsión que contenía 10⁶ ciliados/mL, inactivados con un 0,2% de formalina y adyuvante Montanide ISA 763 A VG (Seppic, Francia) 1:1 (v/v) (Lamas et al., 2008) o adyuvante de hidrogel de quitosano (10 mg/mL). Las muestras de sangre se obtuvieron, después de anestesiarse los peces, mediante punción de la vena caudal el día 60, se dejaron coagular durante 2 h a temperatura ambiente y después se centrifugaron a 2000 x g durante 10 minutos. El suero se almacenó a -20 °C hasta su uso.

7.3.4.2. Análisis macroscópico

Para analizar los posibles daños generados por los adyuvantes se observó la cavidad peritoneal de los rodaballos a los 30 días tras la segunda inmunización.

7.3.4.3. Determinación de los niveles de anticuerpos en suero de rodaballo mediante ELISA

Se siguió el protocolo descrito en el apartado apartado 4.3.7.1.1. con algunas modificaciones. En este caso, las placas se tapizaron con 1 μg de ciliados lisados, se bloquearon, se incubaron con el anticuerpo primario (suero de rodaballo) a una dilución 1:100, se lavaron y, posteriormente, se incubaron con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-Ig de rodaballo (UR3; Estévez et al., 1995) a una dilución 1:1000 durante 15 minutos a 750 rpm a temperatura ambiente. En este punto, las placas se lavaron 5 veces con TBS-T 0,05% y los pocillos se incubaron con un anticuerpo de conejo anti-ratón (1:2000 en TBS-T 0,2%) conjugado con una peroxidasa (Sigma-Aldrich). Finalmente, se llevó a cabo el revelado y la medición de la absorbancia.

Como controles se utilizaron sueros de rodaballos inyectados con PBS.

7.4. RESULTADOS

7.4.1. Estructura y capacidad de absorción del antígeno

Las microfotografías realizadas (Figura 1A) muestran una estructura en forma de entramado cuando el hidrogel está hidratado. Al microscopio de fluorescencia se ha visto que el quitosano presenta autofluorescencia (Figura 1B).

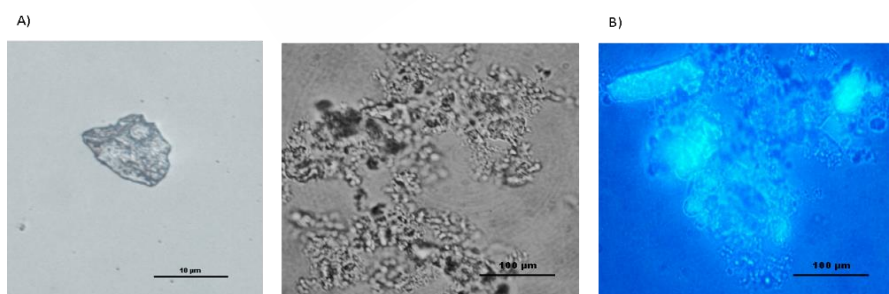


Fig. 1: A) Apariencia al microscopio óptico del hidrogel de quitosano en polvo (izquierda) e hidratado (derecha). B) Microfotografía de una muestra de quitosano hidratado observado al microscopio de fluorescencia.

Al incubar seroalbúmina bovina con el adyuvante, el mayor porcentaje de absorción (70%) se alcanzó transcurridos 30 minutos. Aunque se incrementó el tiempo de incubación hasta las 2 horas, el porcentaje de absorción no aumentó (Figura 2).

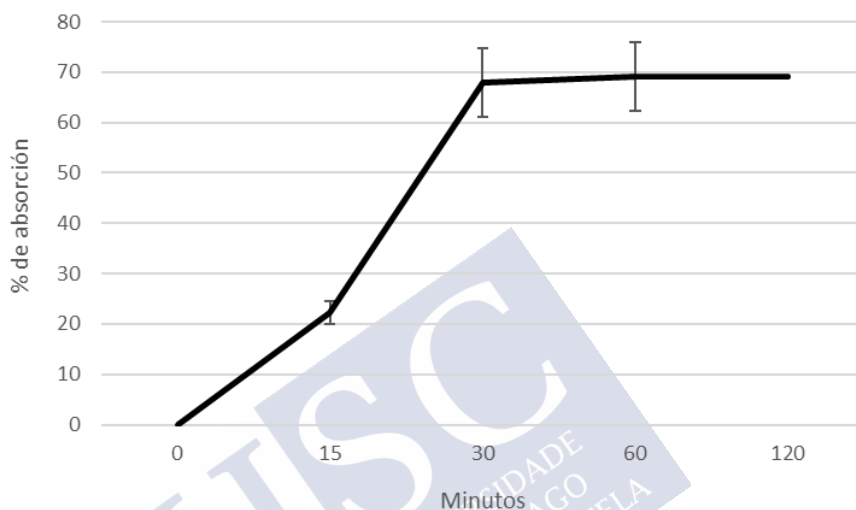


Fig. 2: Porcentaje de absorción del hidrogel de quitosano en función del tiempo. La concentración de quitosano utilizada fue de 10 mg/mL y la de seroalbúmina bovina 1 mg/mL. Los valores se muestran como media \pm la desviación estándar de cinco réplicas.

7.4.2. Diferencias en los niveles de inmunoglobulinas en sueros de ratón inmunizados con distintos adyuvantes y antígenos.

La figura 3 muestra los niveles de anticuerpos específicos en dos sueros diferentes de ratón obtenidos tras la inmunización con adyuvante de hidrogel de quitosano o adyuvante completo de Freund (FCA). En ambos casos el antígeno utilizado para la inmunización fue la proteína recombinante VSP2. Se observó que el quitosano generó un mayor número de anticuerpos en ratones inmunizados que el FCA.

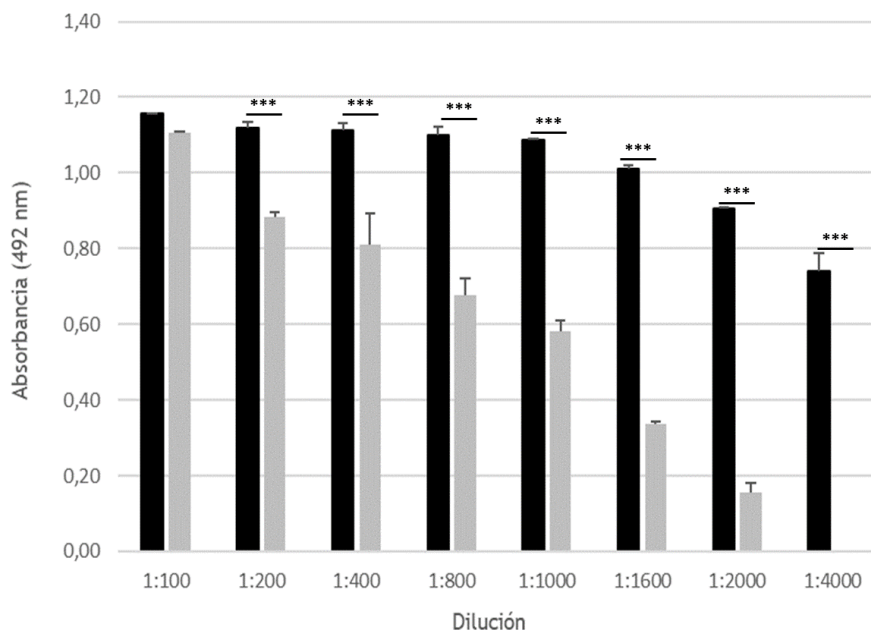
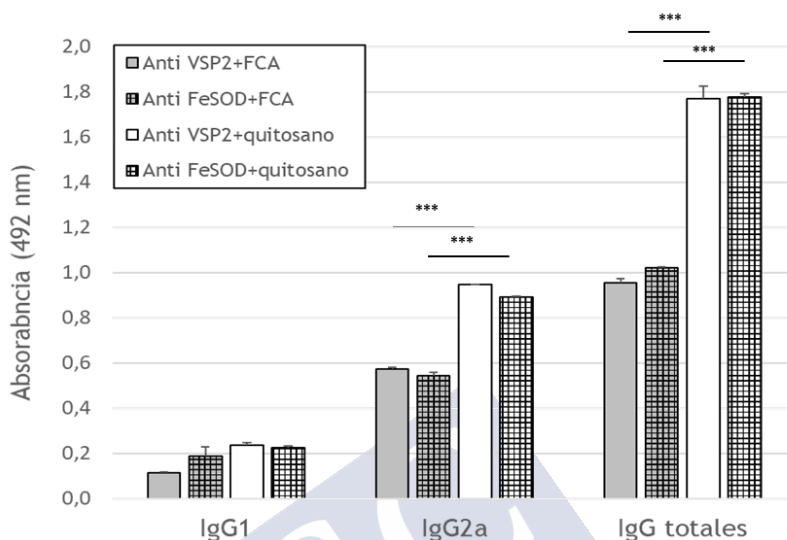


Fig. 3: ELISA comparativo entre los niveles de anticuerpos específicos en suero de ratones inmunizados con VSP2 utilizando como adyuvante hidrogel de quitosano (barras negras) o adyuvante completo de Freund (barras grises). Para la inmunización se utilizó como antígeno la proteína recombinante VSP2. Los valores se muestran como media \pm desviación estándar para tres replicas. Los asteriscos indican el nivel de significación: *** $P < 0,05$.

En cuanto al isotipado, se observa que tanto el FCA como el hidrogel de quitosano generan una respuesta con altos niveles de IgG2a, siendo significativamente mayor con el adyuvante de quitosano (Figura 4). Comparando la respuesta de sueros inmunizados con una proteína recombinante muy glicosilada (VSP2) o poco glicosilada (FeSOD) no se observan diferencias significativas en los niveles de anticuerpos a la hora de utilizar uno u otro antígeno (Figura 4).

A)



B)

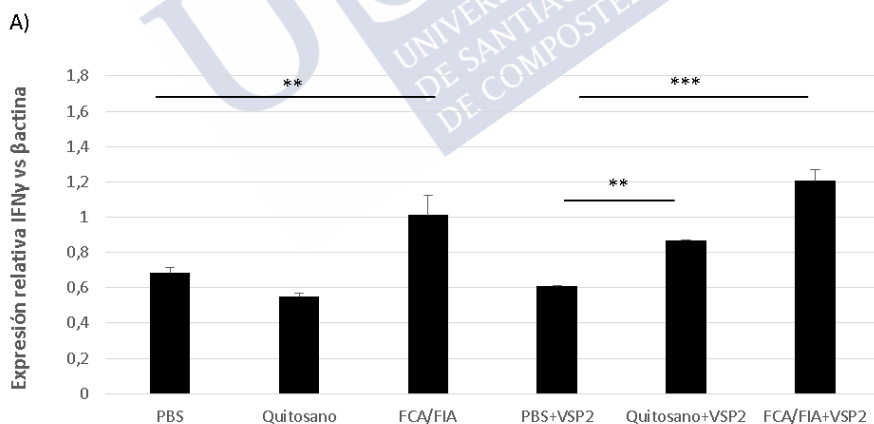
Muestra	IgG2a/IgG1
Anti VSP2+FCA	4,07109827
Anti FeSOD+FCA	2,90391459
Anti VSP2+quitosano	4,02263083
Anti FeSOD+quitosano	3,96153846

Fig. 4: A) ELISA para analizar los niveles de IgG1, IgG2a e IgG totales en suero de ratones inmunizados. Los valores se muestran como media \pm desviación estándar para tres replicas. Los asteriscos indican el nivel de significación: *** $P<0,05$. B) Relación entre los niveles de IgG2a frente a IgG1 para las diferentes muestras.

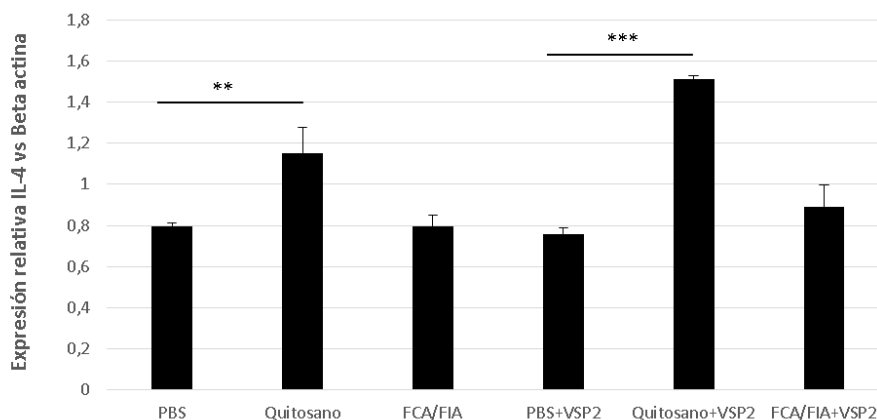
7.4.3. Expresión de los genes IFN γ , IL-4 y TGF β 1

Para evaluar la respuesta que induce el adyuvante de hidrogel de quitosano en comparación con el FCA, se analizó la expresión de genes relacionados con respuestas de tipo Th1 (IFN γ), Th2 (IL-4) y Th17 (TGF β 1). Se observó un incremento en la expresión del IFN γ en las células peritoneales de ratones inyectados con adyuvante de Freund,

tanto con antígeno como sin él, con respecto a los inyectados con PBS (control). También se observó un incremento de la expresión en las células de ratones inyectados con adyuvante de quitosano, pero solo cuando la vacuna contenía antígeno (Figura 5A). Para el gen IL-4, se obtuvo un incremento en la expresión en las células de ratones del grupo quitosano con respecto al grupo PBS. El incremento en la expresión para la IL-4 entre estos dos grupos fue menor cuando el hidrogel de quitosano contenía el antígeno, resultando estadísticamente significativa. Las células de ratones inyectados con FCA (con o sin antígeno), no experimentaron variación en la expresión de la IL-4 con respecto a los grupos inyectados con PBS (Figura 5B). Por último, se analizó la expresión del gen $TGF\beta 1$. Los resultados muestran un aumento significativo de expresión en las células de ratones inyectados con adyuvante de hidrogel de quitosano, tanto cuando la vacuna contenía antígeno como si no, con respecto a los grupos PBS y PBS+VSP2, respectivamente. Para este mismo gen, no se observaron diferencias entre los grupos con FCA y PBS (con y sin antígeno) (Figura 5C).



B)



C)

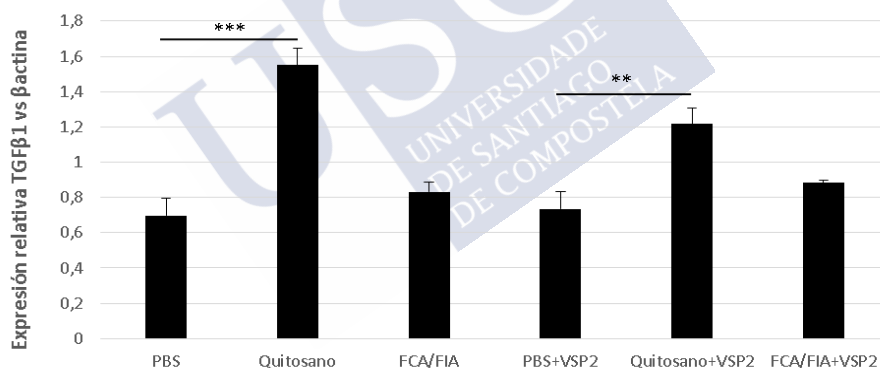


Fig. 5: Análisis de la expresión relativa mediante RT-qPCR. Los genes utilizados para analizar la expresión en células peritoneales de ratones inyectados con adyuvante de Freund (FCA/FIA), adyuvante de hidrogel de quitosano o PBS (con o sin antígeno) fueron A) IFN γ , B) IL-4 y C) TGF β 1. Como antígeno se utilizó la proteína recombinante VSP2 (proteína muy glicosilada). Como gen de referencia se utilizó la beta actina (control). Los valores se muestran como las medias \pm las desviaciones estándar para tres replicas. Los asteriscos indican el nivel de significación: *** P <0,05 y ** P <0,01.

7.4.4. Evaluación de daños en la cavidad peritoneal y niveles de anticuerpos en sueros de rodaballos inmunizados

En las imágenes se observa como los peces inmunizados con Montanide ISA 763 A VG mostraban numerosas adherencias en la cavidad peritoneal, a diferencia de los peces inyectados con la vacuna que contenía quitosano, los cuales apenas presentaban daños (Figura 6).

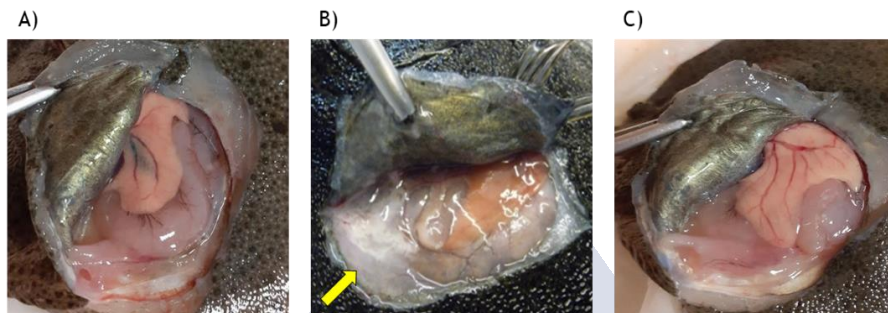


Fig. 6: Imágenes de la cavidad peritoneal de los rodaballos a los 30 días tras la segunda inmunización: A) Inmunizados con PBS (sin adyuvante), B) inmunizados con Montanide e C) inmunizados con higrogel de quitosano. La flecha indica el acúmulo de adyuvante.

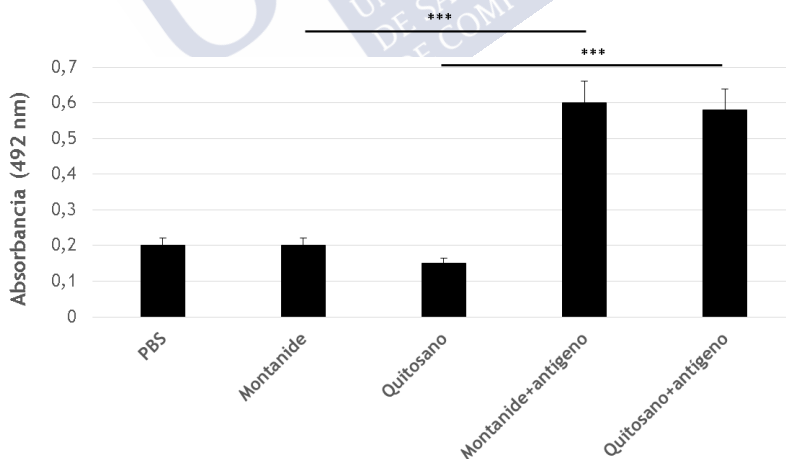


Fig. 7: ELISA que muestra los niveles de IgM en sueros de rodaballos inmunizados. Los valores se muestran como las medias \pm las desviaciones estándar para tres replicas. Los asteriscos indican el nivel de significación: *** $P < 0,05$.

En cuanto al nivel de anticuerpos específicos (IgM), este aumentó tanto en los peces del grupo inmunizado utilizando Montanide como en el grupo de quitosano, con respecto al grupo control inmunizado con PBS o a los grupos control inmunizados solamente con adyuvante. Sin embargo, no hay diferencias significativas entre los valores obtenidos al inmunizar con uno u otro adyuvante (Figura 7).

7.5. DISCUSIÓN

La vacuna por inyección intraperitoneal es el método que induce una mejor respuesta en peces, tanto en la producción de anticuerpos en suero (cantidad y duración) como en la protección generada. Sin embargo, esta elevada respuesta se genera únicamente cuando se incluyen adyuvantes en la vacuna (Tafalla et al., 2014). Una paradoja importante que se da en este método de vacunación es que los adyuvantes que generan una mejor respuesta son precisamente aquellos que causan más daño en la cavidad, como es el caso de los adyuvantes oleosos (Noia et al., 2014).

Como se ha demostrado en numerosos estudios, el quitosano representa una alternativa a los adyuvantes tradicionales, mejorando las respuestas inmunitarias humorales y mediadas por células en ensayos llevados a cabo en ratón donde se comparaba un adyuvante oleoso con el quitosano (Chang et al., 2010; Carroll et al., 2016). Gracias a sus propiedades, el quitosano puede presentarse como adyuvante en diferentes formatos; desde nanopartículas o microesferas; en las cuales el antígeno se pega a la parte externa mediante uniones covalentes debido a la carga, o en forma de emulsiones o hidrogeles donde, además de unirse por la carga, el antígeno queda retenido en la estructura reticulada del adyuvante, lo que le confiere un alto porcentaje de absorción (Li et al., 2013).

En nuestro caso, hemos elaborado un hidrogel que resultó sencillo de preparar además de económico. Por otro lado, este tipo de formato presentó una alta retención del antígeno debido a su alta viscosidad, lo que ayuda a estimular las reacciones inflamatorias dando lugar a una mejora de la respuesta inmunitaria (Morais et al., 2018).

Son numerosos los trabajos que demuestran que el quitosano puede funcionar como adyuvante en vacunas utilizadas en mamíferos (Riteau y Sher, 2016). Algunos estudios sugieren que el quitosano induce una respuesta inmunitaria adaptativa de tipo Th1 (Carroll et al., 2016); sin embargo, hay estudios que indican que el quitosano es capaz de inducir una respuesta Th1 y Th2 en ratón (Wen y col., 2011). En el caso del FCA, este adyuvante genera una respuesta de tipo Th1 en ratón dando lugar a altos niveles de IgG2a, aunque dicha producción puede variar hacia otro tipo de IgG (Lindblad, 2000). Las respuestas Th1 o Th2 son esenciales para la regulación de la proliferación de linfocitos B y el cambio de clase de inmunoglobulinas. La respuesta Th1, inducida por moléculas como el IFN γ , regula la producción de inmunoglobulina IgG2a, mientras que la respuesta Th2, regulada por moléculas como la IL-4, es crítica para la producción de IgG1/IgE en mamíferos (Nurieva y Chung, 2010). Heffernan et al. (2010), observaron que el uso de quitosano en vacunas que contenían proteínas recombinantes como antígeno estimulaba la producción de IgG2a e IgG2b y daba lugar a un aumento en la expresión de IFN γ . En el presente estudio, los resultados obtenidos en ratón muestran que el adyuvante de hidrogel de quitosano genera mayores niveles de anticuerpos específicos que el adyuvante completo de Freund. A partir del ensayo de isotipado, se ha visto que tanto el quitosano como el FCA desencadenan un mayor incremento en la producción de IgG2a con respecto a IgG1, independientemente de si la proteína recombinante utilizada como antígeno esta glicosilada o no. En cuanto a la expresión de genes, la inmunización con FCA (tanto con antígeno como sin él) generó un aumento en la expresión de IFN γ con respecto a la expresión en células peritoneales de ratones que no fueron inyectados con adyuvante (PBS y PBS+VSP2). Para el hidrogel de quitosano, solo se observó un ligero, aunque estadísticamente significativo, incremento de la expresión de IFN γ cuando el adyuvante contenía el antígeno. Algunos autores creen que esto puede deberse a que el quitosano aumenta la inmunidad mediada por células y la respuesta inmunitaria cuando se vacuna con antígeno (Wen et al., 2011). En cuanto a la expresión de IL-4, el aumento de esta con respecto al grupo PBS solo fue significativa en las células peritoneales de ratones inyectados con hidrogel de quitosano, tanto si este contenía o no VSP2.

Los resultados de expresión obtenidos para el IFN γ y para la IL-4 sugieren que FCA desencadena una respuesta adaptativa de tipo Th1, al igual que los niveles de IgG2a del ensayo de isotipado. En el caso del quitosano, los altos niveles de expresión de IL-4 sugieren que este adyuvante induce una respuesta de tipo Th2; sin embargo, los niveles de producción de IgG1 fueron bajos, siendo mayores los de IgG2a. Además, este adyuvante generó un aumento en la expresión de IFN γ cuando fue inyectado con antígeno; por lo que los resultados apuntan a que el hidrogel de quitosano induce una respuesta adaptativa combinada Th1/Th2 en ratón. Algunos autores indican que el quitosano es capaz de inducir la liberación de citoquinas, cambiando el equilibrio Th1/Th2 y activando los macrófagos y las células NK (Wen et al., 2011; Li et al., 2013).

Además, en el caso del quitosano, también se observó un aumento en la expresión del gen TGF β en células de ratón que fueron inyectados con este adyuvante, en comparación con FCA y PBS (con y sin antígeno). Un aumento en la expresión de este gen está asociado a una respuesta de tipo Th17/Threg. En 2016, Ciabattini et al., vieron que un adyuvante generado a partir de un lipopolisacárido inducía una respuesta Th1/Th17, en comparación con un adyuvante de tipo oleoso que generaba una respuesta Th1/Th2. Se ha visto que las respuestas efectoras de Th17 proporcionan una inmunidad independiente del serotipo, mediante la incorporación de monocitos, macrófagos y neutrófilos, y que las células Th17 pueden detectarse semanas después de la vacunación (Chen et al., 2011; Kumar et al., 2013). Estudios recientes sobre la protección heteróloga independiente de anticuerpos proporcionada por las células Th17 abren una nueva vía para el desarrollo de vacunas. En modelos experimentales, las células Th17 son efectivas para proporcionar inmunidad inducida por vacunación frente a diferentes patógenos, por lo que la identificación de antígenos específicos de Th17 ayudará a formular una estrategia de vacunación efectiva independiente del serotipo. Pero no solo eso, sino que la modulación de las propiedades tóxicas y la identificación de nuevos adyuvantes específicos de Th17 también tendrán un tremendo impacto en el diseño de vacunas seguras y efectivas (Kumar et al., 2013).

En el caso del rodaballo, recientemente se ha observado que una formulación de micropartículas en base a quitosano y GantrezTM inducían la generación de niveles elevados de anticuerpos en el suero de peces vacunados con antígeno de *Philasterides dicentrarchi* (León-Rodríguez et al., 2012). De igual modo, los resultados obtenidos a partir del ensayo de vacunación confirman que el adyuvante de hidrogel de quitosano es capaz de generar una buena repuesta con niveles de anticuerpos similares a los obtenidos cuando los peces son inmunizados utilizando el adyuvante oleoso Montanide ISA 763 A VG. Además, el uso de quitosano como adyuvante redujo considerablemente los efectos secundarios adversos asociados al adyuvante Montanide ISA 763, ya que el quitosano no generó adhesiones en la cavidad peritoneal de los peces.

A partir de los resultados de este estudio preliminar, se decidió utilizar el adyuvante de hidrogel de quitosano en un ensayo de vacunación con proteínas recombinantes en peces (capítulo 8). Sin embargo, sería interesante realizar más pruebas a través de ensayos en los que se use el mismo adyuvante en ratones y en rodaballos, analizar la expresión de otros genes relacionados con la respuesta inmunitaria y ver la modulación de estos genes a distintos tiempos tanto en ratón como en rodaballo. Todo esto permitiría tener un conocimiento más amplio del adyuvante de hidrogel de quitosano.

Capítulo 8

VACUNACIÓN CON PÉPTIDO QUIMÉRICO RECOMBINANTE Y ENSAYOS DE PROTECCIÓN EN RODABALLO

8.1. RESUMEN

El desarrollo de una vacuna eficaz supone la selección de un antígeno que genere una buena respuesta y de un adyuvante que resulte inocuo para el rodaballo. Como se ha visto en anteriores capítulos, los antígenos de superficie son los principales candidatos para una vacuna, ya que su inmunogenicidad ha quedado demostrada en distintas especies de ciliados. En este caso, hemos visto que la familia de las VSPs y la familia de las leishmanolisinas son dos familias de proteínas presente en distintas cepas y expresadas bajo diferentes condiciones de cultivo de *P. dicentrarchi*, las cuales han sido relacionadas con la virulencia y los mecanismos de evasión en otros protozoos. Por ello, hemos probado, mediante ensayos protección, la eficacia de 3 proteínas recombinantes (r-VSP2, r-pq-VSPs y r-pq-Leish) en combinación con el adyuvante hidrogel de quitosano, el cual generó buena respuesta en estudios previos. En términos de protección, la combinación de las distintas VSPs en un péptido quimérico resultó ser más eficaz que la inmunización con VSP2. Sin embargo, en comparación con el antígeno entero, los péptidos quiméricos de las VSPs y las leishmanolisinas generaron una menor protección.

8.2. INTRODUCCIÓN

Las vacunas son eficaces herramientas que permiten reducir la mortalidad causada por patógenos que dan lugar a enfermedades infecciosas. Según su composición, se clasifican tradicionalmente como vacunas atenuadas en vivo, que contienen versiones debilitadas en laboratorio del patógeno original, vacunas inactivadas, donde se mata el patógeno, y vacunas de subunidades, compuestas por una o más

moléculas presentes en el patógeno (Kallerup y Foged, 2015). Las vacunas de subunidades pueden estar formuladas a partir de preparaciones antigénicas singulares entre las que se encuentran toxinas inactivadas con antigenicidad original total o parcial, fragmentos completos o proteicos y antígenos quiméricos, donde las partes antigénicas obtenidas de uno o más patógenos son combinados artificialmente en una sola molécula quimérica sintética (péptido) o recombinante. En estos casos las partes antigénicas seleccionadas que conforman los péptidos pueden estar limitadas a un conjunto de epítomos protectores de células B y T (Sette y Fikes, 2003; Blanco et al., 2013). En comparación con las vacunas clásicas (atenuadas o inactivadas vivas) las vacunas peptídicas presentan un inconveniente, y es que son generalmente menos antigénicas y requieren el uso de adyuvantes que potencien su respuesta (Purcell et al., 2007). Sin embargo, ofrecen algunas ventajas, ya que resultan seguras debido a la ausencia de material infeccioso, no existe riesgo de integración o recombinación como podría ocurrir con las vacunas de ADN y permiten la posibilidad de excluir las secuencias perjudiciales de los antígenos, además de una delineación precisa del inmunógeno con facilidad de ampliación, transporte y almacenamiento (Purcell, 2007; Blanco et al., 2013). Por estas razones, las vacunas de péptidos se están investigando en campos tan diversos como el tratamiento del cáncer, la inmunocastración de animales, las enfermedades autoinmunes; así como en la prevención de enfermedades infecciosas virales, bacterianas y parasitarias. Además, se ha estado investigando en el reconocimiento de antígenos quiméricos con el fin de evaluar el efecto de los péptidos presentados en la superficie celular por las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad MHC-I y MHC-II en humanos y especies animales (Shao et al., 2017; Orbegozo-Medina et al., 2019).

En el campo de la parasitología, se están explorando vacunas con epítomos quiméricos para proteger contra las enfermedades causantes de protozoos y helmintos (Kaba et al., 2008; Pinheiro et al., 2014; Anugraha et al., 2015; Gu et al., 2017). Los epítomos son las regiones de una macromolécula reconocidas individualmente por un anticuerpo específico. Los antígenos actúan como estructuras complejas que

constan de varios tipos de epítomos, cada uno de ellos capaz de unirse a un anticuerpo específico diferente. La unión de este con el anticuerpo implicará diferentes niveles de estructura (primaria, terciaria y en algunos casos cuaternaria) (Aguilar et al., 2001). El tamaño del epítopo va a depender del tamaño del sitio de unión del anticuerpo o inmunoglobulina específica y pueden clasificarse en dos tipos: continuos, cuándo se trata de un fragmento corto y lineal capaz de unirse con el anticuerpo como si se tratase de una proteína entera, o discontinuos, constituidos por residuos que no son continuos en la secuencia de aminoácidos pero que presentan proximidad espacial debido al plegamiento de la proteína. Estos últimos representan a la mayoría de los epítomos. En la mayor parte de los casos, las proteínas globulares son potencialmente antigénicas y conforman un gran número de epítomos parcialmente superpuestos (Orbegozo-Medina et al., 2019).

Desde hace años los péptidos se vienen utilizando tanto en el diseño molecular de vacunas como en el desarrollo de sistemas de diagnóstico para la detección de enfermedades infecciosas de origen bacteriano (Alcaro et al., 2003), viral (Pérez, 2007), o parasitario (Noya et al., 2003). Resulta de gran importancia la identificación de dominios inmunodominantes de epítomos que sean capaces de inducir una respuesta inmune protectora; inmunidad humoral y/o inmunidad mediada por células contra el antígeno deseado. Por lo tanto, la selección del epítopo tendrá que ser dirigida no sólo hacia la inducción de la respuesta efectora deseada (células B o células T), sino también para la inducción de respuestas de células T auxiliares. Uno de los principales factores que va a condicionar la antigenicidad del péptido es su tamaño. Ya en 1995, Li sugirió que los péptidos pequeños son menos inmunogénicos, siendo más eficaces los péptidos quiméricos constituidos por dos o más epítomos en una misma molécula. Con el paso de los años esta teoría ha sido reforzada y confirmada en otros estudios (Silva-Flannery et al., 2009; Gershoni-Yahalom et al., 2010). Además, los péptidos cortos tienen una conformación inestable en solución lo que supone que solo una parte adopta una conformación comparable a la del lugar antigénico de la proteína completa. En este caso, la reactividad frente a anticuerpos se puede mejorar llevando a

cabo una ciclación del péptido, lo que reduce las posibilidades conformacionales de las secuencias lineales. De igual forma, se pueden obtener distintos resultados modificando la estructura del péptido ya que distintas conformaciones (lineales, con ramificaciones, circularizados, etc.) le van a conferir distintas propiedades (Kopple, 1972; Pérez, 2007). Sin embargo, es difícil predecir la posible acción de un epítopo después de una perturbación o variación en la estructura del péptido una vez inyectado en el organismo de estudio, además de otras variaciones asociadas al proceso biológico, ensayo experimental, etc. Con el fin de reducir dichas perturbaciones se pueden seguir modelos computacionales para el diseño de vacunas que pueden ser útiles para la optimización de péptidos o la predicción de nuevos epítopos (González-Díaz et al., 2014). También existen herramientas informáticas que permiten predecir la localización de epítopos lineales de células B (<http://ailab.ist.psu.edu/bcpreds/predict.html>) y/o la antigenicidad de la vacuna (<http://www.ddg-pharmfac.net/vaxijen/VaxiJen/VaxiJen.html>). La herramienta bioinformática PredBALB / c (Zhang et al., 2005) permite la predicción de la unión del péptido a las moléculas del MHC de clase II (I-A e I-E) del ratón BALB / c (H-2d). Esta herramienta utiliza matrices cuantitativas validadas utilizando aglutinantes y no aglutinantes determinados experimentalmente, así como estudios *in vivo* con proteínas virales. Los parámetros peptídicos, como los valores teóricos de peso molecular, índices alifáticos y promedios de hidropatía (GRAVY) se pueden calcular utilizando la herramienta bioinformática ProtParam de Expasy (<https://www.expasy.org/resources>) (Orbegozo-Medina et al., 2019).

En los últimos años, el uso de péptidos en formulaciones vacunales se ha dirigido hacia el empleo de multipectidos ya que se ha visto que la conformación de un péptido quimérico genera un mayor número de anticuerpos y una mayor protección. Los antígenos de péptidos lineales quiméricos se pueden construir poniendo una selección de epítopos juntos en tándem (Golvano et al., 1990) o utilizando separadores; es decir, secuencias espaciadoras entre ellos. El uso de separadores va a condicionar la inmunogenicidad del péptido. Estos separadores son

aminoácidos que, en función de su tamaño, van a permitir unas conformaciones u otras de las secuencias lineales. La elección de un tipo u otro de separador va a depender del epítipo, y de la ordenación y disposición del péptido. Algunos de estos pueden ser naturales; secuencias cortas de aminoácidos que conectan diferentes dominios en una sola proteína (Chichili et al., 2012). Se sabe que las regiones ricas en glicina proporcionan flexibilidad y, en consecuencia, facilitan las interacciones entre dominios, mientras que las regiones ricas en prolina generan rigidez e interacciones desfavorables (Chichili et al., 2012). En el diseño de vacunas quiméricas, los enlazadores ricos en combinados con serina (por ejemplo, GSGSG) o prolina (por ejemplo, GP GPG) fueron analizados en varios estudios (Wen et al., 2015; Nezafat et al., 2016). Otros separadores utilizados fueron los formados por pares de residuos básicos como la lisina o la arginina (KK, KR, RR), los cuales se relacionaron con la presentación del antígeno a las células T (Takahashi et al., 1989), por lo que un número considerable de autores utilizó el enlazador KK para unirse a los epítopos T y B en un intento de minimizar la formación de neoepítopos, un problema que es más relevante al aumentar la longitud de las secuencias del separador (Sarobe et al., 1993; Yano et al., 2005; Schubert y Kolbacher, 2016). Otro problema en la construcción de antígenos peptídicos quiméricos es definir cuál es el mejor número y posición para colocar cada uno de los epítopos de las células T y B a lo largo de la secuencia del péptido, ya que la orientación o polarización de los epítopos es de gran relevancia a la hora de obtener respuestas óptimas a partir de las vacunas. En la construcción de antígenos epitópicos quiméricos también se debe tener en cuenta que, además de la posible formación de neoepítopos B, la combinación de secuencias enlazadoras (separadores) con un solo epítipo B *a priori* puede conducir a la formación de nuevos epítopos T (neoepítopos T) capaces de ser o no ser reconocidos por las moléculas altamente polimórficas de MHC-II en las células presentadoras de antígeno (Golvano et al., 1990; Lowenadler et al., 1992; Blanco et al., 2013).

En peces las respuestas de anticuerpos son muy diferentes a las generadas en mamíferos y se caracterizan por producir solo anticuerpos

de isotipos similares a IgM e IgA. En el caso de los rodaballos, en un estudio realizado por Orbegozo-Medina en 2019, se obtuvo una alta respuesta de anticuerpos frente a epítomos de células B al inmunizar los peces con vacunas que contenían quimeras diseñadas a partir de fragmentos de secuencias de proteínas del parásito trematodo *Fasciola hepatica* separados por enlazadores tipo -KK-. Estos resultados sugieren que la elaboración de vacunas quiméricas peptídicas para ensayos de protección en rodaballo contra patógenos es factible siempre que los epítomos B (o T-B) seleccionados se combinen adecuadamente.

En base a todos estos datos, y los resultados reflejados en el capítulo 6, se diseñaron péptidos quiméricos a partir de secuencias de proteínas de las familias de las VSPs y de las leishmanolisinas. Estos péptidos fueron utilizados como antígenos en ensayos de vacunación en rodaballo, en los que se utilizó como adyuvante hidrogel de quitosano (capítulo 7).

8.3. MATERIALES Y MÉTODOS

8.3.1. Animales de experimentación

Además de rodaballos y ratones, cuyo mantenimiento y proceimientos de manipulación ya se han descrito anteriormente, para los estudios desarrollados en este capítulo también se utilizó un conejo (*Oryctolagus cuniculus* Linnaeus, 1758) de la cepa New Zealand White que fue inmunizado para la obtención de suero de conejo anti-r-pq-VSPs. Previamente, se obtuvo una alícuota de sangre del conejo para disponer de suero pre-inmune para utilizar como control en los distintos ensayos. A continuación, se realizaron 4 inmunizaciones mediante inyección por vía subcutánea. Cada inmunización consistió en 10 inoculaciones de 100 μ L cada una. La primera inmunización se realizó con 500 μ g de r-pq-VSPs en 1 mL de adyuvante completo de Freund. A los 15 días, se llevó a cabo una segunda inmunización en la que se administraron 250 μ g de r-pq-VSPs en 1 mL de adyuvante incompleto de Freund. A los 30 días se realizó la tercer inmunización y a los 45 días la cuarta y última inmunización (siguiendo en estos dos últimos casos el protocolo de vacunación realizado en la segunda inmunización). Al día 60 se anestesió y sacrificó al animal mediante exanguinación

completa para la obtención de suero inmune, el cual fue almacenado a - 80°C hasta su uso.

8.3.2. Antígenos

Para realizar un estudio comparativo, por un lado, se utilizó como antígeno la proteína recombinante r-VSP2 y, por el otro, un recombinante de un péptido quimérico diseñado a partir de las 7 secuencias de aminoácidos para las distintas VSPs (r-pq-VSPs) (apartado 6.4.11.). También se utilizó un péptido quimérico recombinante a partir de secuencias parciales de 6 proteínas de la familia de las leishmanolisinas (r-pq-Leish) (apartado 6.4.12.). Además, otro grupo de peces fue inmunizado con la mezcla al 50% de cada uno de estos péptidos quiméricos (r-pq-VSPs+LEISH).

Para la síntesis de los péptidos quiméricos, primero se seleccionó que partes de las proteínas eran potencialmente más antigénicas, y que por lo tanto, podrían dar lugar a epítomos, con el programa IEDB analysis resource-Antibody Epitope Prediction (<http://tools.immuneepitope.org/bcell/>). Estas secuencias parciales se dispusieron linealmente y separadas entre si por un separador formado por dos lisinas (-KK-). En el extremo C-terminal se añadió una cola de histidinas, para poder purificar la proteína recombinante sintetizada en levadura.

En el caso del r-pq-VSPs, la secuencia de nucleótidos (696 pares de bases) codifica para una proteína de 232 aminoácidos de peso molecular 24,9 kDa y punto isoelectrico teórico 9.55. En el caso del r-pq-Leish, la secuencia de nucleótidos (675 pares de bases) codifica para una proteína de 225 aminoácidos de peso molecular 25,3 kDa y punto isoelectrico teórico 9.45. Con el programa TMHMM Server v. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) y con la herramienta NetOGlyc 4.0 server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>) se confirmó que los péptidos quiméricos diseñados no contenían hélices de transmembrana y que presentaban múltiples sitios de glicosilación.

A continuación, y tal y como se describe en el apartado 4.3.5, las secuencias de los péptidos quiméricos diseñados fueron modificadas y

optimizadas para la producción de las proteínas recombinantes (r-pq-VSPs y r-pq-Leish) en *Kluveromyces lactis*. En este caso, los cebadores utilizados fueron:

(FqrVSPs) 5'-CGCCTCGAGAAAAGAATGCGTCGTACTCTATGACG – 3' /
(RqrVSPs) 5'-ATAAGAATGCGGCCGCTTAATGGTGGTGATGATGATGG
TGATGGTGAAGACTCTGAGAATCGTCACA – 3'; (FqrLEISH) 5'
- CGCCTCGAGAAAAGAATGAAACAAATAATTGCCCTA – 3' /
(RqrLEISH) 5' – ATAAGAATGCGGCCGCTTAATGATGATGGTGATGGTGATGA
TGTTGGTGCCAATGACTCCCTGCACCTCC – 3'.

En el ensayo de vacunación también se utilizaron como antígenos ciliados formolizados (antígeno entero).

8.3.2.1. Caracterización del péptido quimérico recombinante r-pq-VSPs

Antes del ensayo de vacunación en rodaballo, se llevó a cabo una caracterización preliminar de la antigenicidad del r-pq-VSPs mediante ensayos serológicos con sueros de ratón y conejo. Para ello, primero se inmunizaron 5 ratones y un conejo con el péptido r-pq-VSPs y se obtuvo suero de ratón y conejo anti-r-pq-VSPs (apartados 4.3.6.1 y 8.3.1., respectivamente). Posteriormente, se hizo un Western Blot (apartado 4.3.6.4.) utilizando como antígeno r-pq-VSPs (como control positivo) y ciliados lisados de las cepas I1, C1, y B1 frente a sueros anti-r-pq-VSPs de ratón (1:100) y suero anti-r-pq-VSPs de conejo (1:500) (también se utilizaron sueros de ratón y conejo pre-inmunes a las mismas concentraciones como controles negativos del ensayo). Para el Western Blot de conejo se utilizó un anticuerpo secundario de cerdo anti Ig G de conejo conjugado con peroxidasa (Dakopatts, EEUU) a una dilución 1:2000.

8.3.3. Ensayo de vacunación en rodaballos: control de peso, análisis de daños, obtención de suero, análisis del nivel de anticuerpos mediante ELISA y antigenicidad mediante Western Blot

Para el ensayo de vacunación se utilizaron 100 peces por grupo. Para la inmunización se utilizó como antígeno ciliados enteros (10^6 trofozoitos/mL en PBS con 0,1% de formol), r-VSP2 (250 µg/pez), r-pq-VSPs (250 µg/pez), r-pq-LEISH (250 µg/pez). Como adyuvantes se utilizaron Montanide ISA 763 A VG e hidrogel de quitosano 1:1 v/v. Cada rodaballo se inmunizó i.p. con 200 µl de vacuna correspondiente. A uno de los grupos se le inyectó PBS como controles del ensayo.

50 peces de los grupos los distintos grupos fueron reservados para el control de peso y para el análisis de daños; además de ser utilizados para la obtención de suero (apartado 7.3.4.1.), el análisis del nivel de anticuerpos (apartado 7.3.4.3.) y antigenicidad mediante Western Blot (apartado 6.3.2.2.2.).

Los 50 peces restantes de cada grupo se utilizaron en el reto infeccioso.

8.3.4. Ensayo de infección

Los peces fueron infectados con 5×10^5 trofozoitos/pez en PBS por vía i.p. (apartado 3.3.8.). La infección fue confirmada *post mortem* por la presencia de ciliados en órganos y tejidos.

8.4. RESULTADOS

8.4.1. Análisis de la antigenicidad del péptido quimérico recombinante r-pq-VSPs en ratón y conejo

El suero de ratón y el suero de conejo anti-r-pq-VSPs reconocieron la proteína r-pq-VSPs (control positivo del ensayo) y distintas proteínas tanto en las muestras de ciliados sonicados de la cepa I1 como de la cepa C1 de *P. dicentrarchi*; sin embargo, los sueros reconocieron diferentes antígenos, siendo estos menores de 48 kDa para el suero de ratón y mayores de 48 kDa para el suero de conejo (Figura 1).

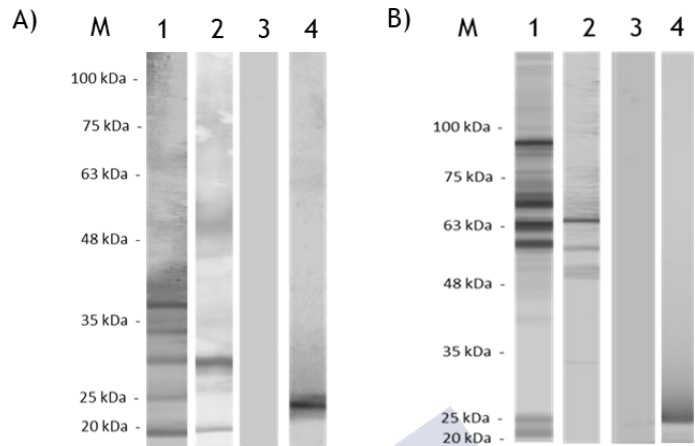


Fig. 1: Western Blot 1: ciliados sonicados de la cepa I1, 2: ciliados sonicados de la cepa C1, 3: ciliados sonicados de la cepa B1 y 4: r-pq-VSPs frente a A) suero de ratón anti-r-pq-VSPs y B) suero de conejo anti-r-pq-VSPs. Marcador de peso molecular en kDa (M).

Ninguno de los dos sueros reconoció ninguna proteína en la muestra de ciliados lisados de la cepa B1 *P. dicentrarchi*.

8.4.2. Control de peso y análisis de los daños

Los peces (50 por grupo) se pesaron transcurridos 60 días tras a primera inmunización. Como se observa en la tabla 1, los peces inmunizados incrementaron en menor medida su peso en comparación con el grupo control (PBS) y el grupo inmunizado con quitosano)

Grupo	Peso medio (g)
PBS	107
Montanide+r-pq-VSPs	93*
Quitosano+r-pq-VSPs	107

Tabla 1: Valores medios del peso de los 50 peces de cada grupo en gramos. El asterisco indica el nivel de significación (* $P < 0,01$).

Los peces de los grupos inmunizados con r-pq-VSPs con Montanide o quitosano se abrieron para realizar un análisis macroscópico de la cavidad peritoneal. Los daños se valoraron entre 0 y 6; donde 0: normal; 1: alguna adherencia dispersa entre órganos internos; 2: algunas adherencias que unen órganos internos con la pared de la cavidad peritoneal; 3: adherencias moderadas con la presencia de pequeños granulomas visibles; 4: adherencias moderadas con grandes granulomas visibles; 5: adherencias extensas que afectan a órganos internos (con fusión entre ellos) y adherencias de los órganos a la pared de la cavidad; 6: los órganos internos forman un bloque con la pared de la cavidad. En la tabla 2 se muestran los valores medios de los daños analizados en 10 peces por grupo, observándose que los daños generados por el adyuvante Montanide son muchos más evidentes y severos que los generados por el adyuvante de hidrogel de quitosano.

Grupo	Valor de daños
Montanide+r-pq-VSPs	4,7
Quitosano+r-pq-VSPs	2,3

Tabla 2: Valor de daños asociado al grupo inmunizado utilizando como adyuvante Montanide y al grupo inmunizado utilizando como adyuvante quitosano. Los valores representados corresponden a la media del análisis realizado a 10 peces por grupo.

8.4.3. Niveles de anticuerpos y antigenicidad del r-pq-VSPs en rodaballo

En la figura 2 se muestran los niveles de anticuerpos para los distintos grupos. El suero de los rodaballos inmunizados con antígeno entero y quitosano presentó mayores niveles de IgM que el suero de los rodaballos inmunizados con este mismo antígeno pero utilizando como adyuvante Montanide. En el caso del péptido quimérico recombinante de las VSPs se generaron menos niveles de anticuerpos que al inmunizar con el ciliado entero; sin embargo, estos niveles fueron significativamente más elevados que los producidos al inmunizar utilizando como antígeno solamente la proteína recombinante r-VSP2. El péptido quimérico recombinante de las lesihmanolisinas (r-pq-

LEISH) generó unos niveles de anticuerpos similares a los del péptido r-pq-VSPs; sin embargo, la combinación de ambos péptidos quiméricos recombinantes en una misma vacuna generó altos niveles de anticuerpos, equiparables a los generados al utilizar como antígeno el ciliado entero.

Los sueros de rodaballo anti-r-VSP2 y anti-r-pq-VSPs también se utilizaron para realizar un Western Blot. Ambos sueros reconocieron proteínas del ciliado (cepa I1); sin embargo, el suero generado frente a la VSP2 solo marcó proteínas de unos 63 kDa, mientras que el péptido quimérico recombinante marcó varias proteínas de distintos pesos moleculares (Figura 3).

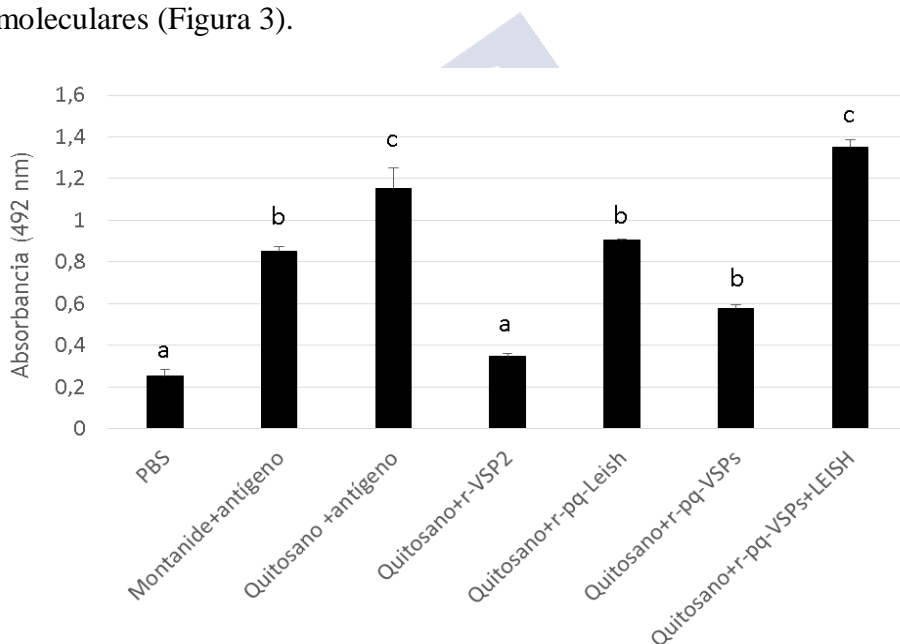


Fig. 2: ELISA que muestra los niveles de IgM en sueros de rodaballos inmunizados. Los valores se muestran como las medias \pm las desviaciones estándar para tres replicas. Las letras indican el nivel de significación: a, b: $P < 0,001$; b, c: $P < 0,05$; a, c: $P < 0,1$.

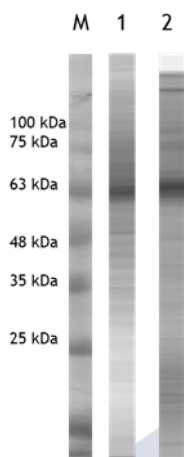


Fig. 3: Western Blot con suero de rodaballo anti-r-VSP2 (1) y suero de rodaballo anti-r-pq-VSPs (2) frente a ciliados de la cepa I1 de *P. dicentrarchi*. Marcador de peso molecular en kDa (M).

8.4.4. Grado de protección

Para evaluar la protección de cada vacuna 50 peces de cada grupo fueron utilizados para el reto infeccioso. Como se observa en la figura 4, durante los 14 días que duró el ensayo, murieron por escuticiliatosis un 82,5% de los peces que habían sido inyectados con PBS (control sin vacuna). El grupo que contenía hidrogel de quitosano como adyuvante y antígeno entero fue el que más resistió a la infección, la cual a penas superó el 10%. Estos valores aumentan en el grupo en el que se utilizó Montanide como adyuvante (en torno al 40% de mortalidad). En cuanto al antígeno, se aprecia que los grupos inmunizados con péptidos quiméricos recombinantes (r-pq-VSPs, r-pq-LEISH y la combinación de ambos) presentaron una mortalidad similar al grupo de Montanide con antígeno entero; mientras que el porcentaje de rodaballos muertos en el grupo inmunizado con la proteína recombinante VSP2 ascendió hasta el 72% (valores similares al control).

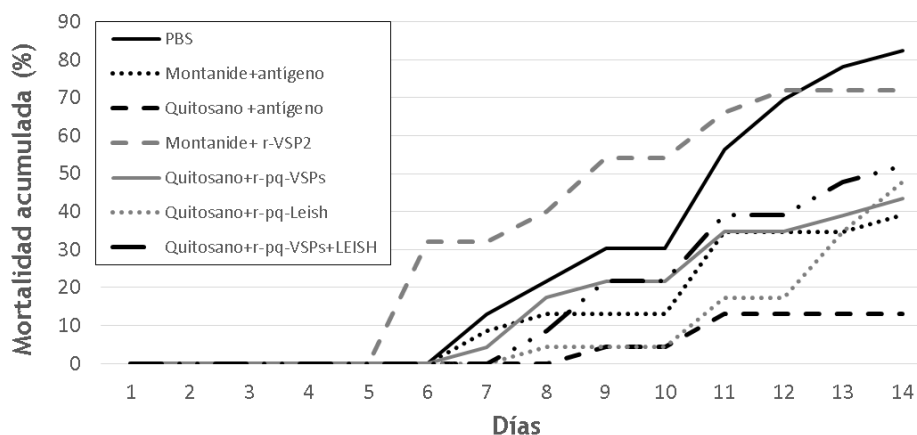


Fig. 4: Mortalidad expresada como porcentaje, obtenida tras la inoculación de rodaballos con 5×10^5 ciliados de la cepa I1 de *P. dicentrarchi*.

8.5. DISCUSIÓN

Como se ha comentado en anteriores capítulos, en los últimos años se han utilizado proteínas de superficie recombinantes como antígeno en vacunas. Sin embargo, las proteínas recombinantes resultan poco inmunogénicas por lo que resulta necesario combinarlas con un adyuvante que genere una buena respuesta para que resulten eficaces (Morais et al., 2018).

Algunos autores, en lugar de utilizar una única proteína como antígeno, han unido distintas proteínas dando lugar a un péptido quimérico con el fin de generar más epítomos y así obtener una mayor respuesta (Shao et al., 2017). Se ha visto, que es posible inducir buenas respuestas de anticuerpos T a partir de péptidos quiméricos relativamente cortos que combinan “*a priori*” epítomos de células B. En 2019, Orbegozo-Medina et al., vieron que al usar un separador corto (-KK-) la formación de neoepítomos de células B era menos probable en comparación con separadores más grandes y por lo tanto flexibles, mejorándose así la respuesta de los péptidos quiméricos en rodaballo. En nuestro caso, para el diseño de los péptidos quiméricos, también utilizamos dos lisinas como separadores entre las secuencias antigénicas de las 7 proteínas de las VSPs o de las leishmanolisinas,

respectivamente, las cuales fueron seleccionadas a partir del mismo programa de predicción de antigenicidad utilizado por estos autores. Los ensayos inmunológicos preliminares confirman la antigenicidad del r-pq-VSPs tanto en ratón como en conejo, si bien el anticuerpo parece reconocer distintos antígenos. Algunos autores han descrito como un mismo antígeno puede dar lugar a diferentes epitopos en diferentes organismos (Orbegoza-Medina en 2017).

Con el fin de obtener una vacuna eficaz; es decir, que genere protección y que sea inocua para el rodaballo, hemos realizado pruebas utilizando como antígeno la proteína recombinante VSP2.0 (r-VSP2) o los péptidos quiméricos recombinantes formados por distintas fracciones de proteínas de las familias de las VSPs (r-pq-VSPs) y de las leishmanolisinas (r-pq-LEISH) en combinación con un adyuvante de hidrogel de quitosano.

Para comparar los efectos de estas nuevas vacunas con las usadas habitualmente, también se inmunizaron rodaballos utilizando como antígeno ciliados formolizados y como adyuvante Montanide ISA 763 A VG. Trascurridos los dos meses tras la primera inmunización se observa una clara diferencia en el tamaño entre aquellos peces que fueron inmunizados con hidrogel de quitosano o Montanide. Una vez abiertos los peces, se observan daños en la cavidad peritoneal de los peces que fueron vacunados con el adyuvante oleoso. Principalmente, los peces presentan adherencias extensas que afectan a órganos internos por el efecto del adyuvante. Es lógico pensar que, al producirse estos daños en los órganos internos del pez este no se alimenta de manera óptima y, por lo tanto, no crece de igual modo que lo hacen los peces control, que no llevan adyuvante, o los que han sido inmunizados con hidrogel de quitosano, el cual resultó ser menos dañino para el rodaballo. En 2014, Noia et al., vieron que el quitosano, en este caso en forma de nanopartículas, generaban menos daños en la cavidad de los rodaballos en comparación con otros adyuvantes oleosos, donde se observó un menor crecimiento de los peces.

A la hora de analizar el nivel de anticuerpos, si comparamos los dos adyuvantes, se observaron diferencias significativas entre el grupo

de rodaballos inmunizados con ciliados formolizados y Montanide con respecto al grupo inmunizado con ciliados formolizados e hidrogel de quitosano, siendo más elevado en este último grupo. Resultados similares fueron obtenidos por León-Rodríguez et al. (2014), al comparar nanopartículas de quitosano con FCA. Los valores obtenidos para el grupo inmunizado con el péptido quimérico recombinante de las VSPs fueron menores; sin embargo, estos resultaron ser más elevados que los generados en los rodaballos inmunizados utilizando como antígeno r-VSP2. Estos resultados, junto con los obtenidos a partir de Western Blot, sugieren que el péptido quimérico resultó ser más antigénico al generar un mayor número de epitopos que la proteína recombinante VSP2, lo que finalmente se tradujo en términos de protección; donde r-pq-VSPs generó una protección mayor que r-VSP2. Estos resultados de protección; si bien son menores a los generados por la vacuna de hidrogel de quitosano y antígeno entero, sugieren que el uso de péptidos quiméricos en los que se combinen diferentes antígenos puede resultar una buena alternativa ya que, además, muchos autores han confirmado la inmunidad protectora de los antígenos de superficie recombinantes (Musoke et al., 1992; Mello et al., 2004).

A la vista de los resultados obtenidos tras estos ensayos preliminares se plantea la opción de ahondar en la búsqueda de más antígenos que se expresen de manera diferencial entre distintas cepas o bajo diferentes condiciones de cultivo, así como combinarlos para generar péptidos quiméricos que puedan dar lugar a protección frente a diferentes cepas del ciliado. En estos ensayos las potenciales vacunas estarían formuladas por proteínas quiméricas recombinantes en un adyuvante de hidrogel de quitosano.

CONCLUSIONES

1.- El método de criocongelación desarrollado en el presente trabajo permite conservar indefinidamente de una forma eficiente los ciliados, manteniendo su virulencia y conservando inalterados los antígenos inmunogénicos involucrados en la protección, lo que facilitará la producción y la reproducibilidad de las vacunas desarrolladas frente a la escuticociliatosis del rodaballo.

2.- *P. dicentrarchi* posee tres tipos de superóxido dismutasas (Cu/ZnSODs, MnSOD y FeSOD) involucradas en la defensa frente al estrés oxidativo generado tanto en el ambiente marino como durante la respuesta inmunitaria en el hospedador. Debido a la gran importancia que poseen estas enzimas para la supervivencia del ciliado y las diferencias que presentan con las enzimas del rodaballo, podrían suponer una potencial diana terapéutica para el desarrollo de fármacos y, en el caso de las SODs extracelulares, también para el diagnóstico y la producción de vacunas.

3.- *P. dicentrarchi* utiliza la exocitosis de material endógeno mediada por Ca^{2+} extracelular a través de los extrusomas como mecanismo de protección física, permitiéndole al ciliado defenderse de la acción lítica de los componentes humorales del sistema inmunitario innato del hospedador. El empleo de fármacos inhibidores de la liberación de Ca^{2+} intracelular y/o la producción de proteínas recombinantes de la matriz de los extrusomas, usadas como antígenos en vacunas, podrían utilizarse como estrategias frente a la escuticociliatosis.

4.- Utilizando diferentes técnicas, hemos conseguido identificar varias proteínas variables de superficie, las cuales presentan una elevada capacidad inmunogénica y se expresan diferencialmente entre aislados de distinto serotipo, lo que las convierte en buenas candidatas para la generación de vacunas.

5.- También hemos identificado una familia de proteínas tipo leishmanolisinas en *P. dicentrarchi*. Estas metaloproteasas de membrana poseen un potencial papel en la virulencia del ciliado y podrían ser moléculas clave para el desarrollo de futuras vacunas.

6.- Se ha desarrollado un nuevo adyuvante formado por hidrogel de quitosano que resultó tener una capacidad inmunoestimulante comparable con la de los adyuvantes oleosos utilizados hasta la fecha pero que presenta menores efectos secundarios.

7.- Las vacunas conteniendo péptidos quiméricos procedentes de proteínas de membrana como las proteínas variables de superficie y leishmanolisinas, o la mezcla de ambas, formuladas en un adyuvante de hidrogel de quitosano, han generado una buena respuesta inmunitaria en el rodaballo y una cierta protección frente a la infección. Todo ello parece indicar que este tipo de moléculas podrían constituir la base para el desarrollo de futuras vacunas frente a *P. dicentrarchi*.

BIBLIOGRAFIA

Adam, R.D. (2001). Biology of *Giardia lamblia*. Clin Microbiol Rev 14: 447-475.

Adl, S. M.; Simpson, A. G.; Farmer, M. A.; Andersen, R. A.; Anderson, O. R.; Barta, J. R.; Bowser, S. S.; Brugerolle, G.; Fensome, R. A.; Fredericq, S.; James, T. Y.; Karpov, S.; Kugrens, P.; Krug, J.; Lane, C. E.; Lewis, L. A.; Lodge, J.; Lynn, D. H.; Mann, D. G.; McCourt, R. M.; Mendoza, L.; Moestrup, O.; Mozley-Standridge, S. E.; Nerad, T. A.; Shearer, C. A.; Smirnov, A. V.; Spiegel, F. W. & Taylor, M. F. (2005). The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. Journal Eukaryotic Microbiology, 52(5): 399-451.

Adoutte, A.; Garreau de Loubresse, N. & Beisson, J. (1984). Proteolytic cleavage and maturation of the crystalline secretion products of *Paramecium*. Journal of Molecular Biology, 180: 1065-1080.

Afonso, A.; Gomes, S.; da Silva, J.; Marques, F. & Henrique, M. (2005). Side effects in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) due to intraperitoneal vaccination against vibriosis and pasteurellosis. Fish and Shellfish Immunology, 19: 1-16.

Aguilar, A.; Carrazana, Y. & Duarte, C. A. (2001). Impact of epitope permutations in the antibody response of mice to a multi-epitope polypeptide of the V3 loop of human immunodeficiency virus type 1. Biomolecular Engineering, 18: 117-124.

Akhter, N.; Wu, B.; Memon, A. M. & Moahsin, M. (2015). Probiotics and prebiotics associated with aquaculture: A review. Fish and Shellfish Immunology, 45: 733-741.

Alcaro, M. C.; Peroni, E.; Rovero, P. & Papini, A. M. (2003). Synthetic peptides in the diagnosis of HIV infection. Current Protein and Peptide Science, 4: 285-290.

Alscher, R. G.; Erturk, N. & Heath, L. S. (2002). Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany*, 53: 1331-1341.

Álvarez-Pellitero, P.; Palenzuela, O.; Padrós, F.; Sitjà-Bobadilla, A.; Ríaza, A.; Silva, R. & Arán, J. (2004). Histophagous scuticociliatids (Ciliophora) parasitizing turbot *Scophthalmus maximus*: morphology, *in vitro* culture and virulence. *Folia parasitológica*, 51: 177–187.

Anderson, S. A.; Hulston, D. A.; McVeagh, S. M.; Webb, V. L. & Smith, P. J. (2009). *In vitro* culture and cryopreservation of *Uronema marinum* isolated from farmed New Zealand groper (*Polyprion oxygeneios*). *Journal of Microbiological Methods* 79: 62-66.

Andrew, S. M. & Titus, J. A. (2001). Fragmentation of immunoglobulin M. *Current protocols in immunology*. 38:III:2.10A:2.10A.1–2.10A.5.

Angius, F.; Iliaia, O.; Uzan, M. & Miroux, B. (2016). Cap. 3 “Membrane Protein Production in *Escherichia coli*: Protocols and Rules” (pp. 37-52) en *Heterologous Expression of Membrane Proteins: Methods and Protocols*, *Methods in Molecular Biology*, vol. 1432 (ed. Mus-Veteau, I.). Springer Science & Business Media, New York. EEUU.

Anugraha, G.; Madhumathi, J.; Prince, P. R.; Prita, P. J.; Khatri, V. K.; Amdare, N. P.; Reddy, M. V. & Kaliraj, P. (2015). Chimeric epitope vaccine from multistage antigens for lymphatic filariasis. *Scandinavian Journal of Immunology*, 82: 380-389.

Ashfaq, H.; Soliman, H.; Saleh, M. & El-Marbouli, M. (2019). CD4: a vital player in the teleost fish immune system. *Veterinary Research*, 50(1): 1-11.

Asojo, O. A.; Schott, E. J.; Vasta, G. R. & Silva, A. M. (2006). Structures of PmSOD1 and PmSOD2.; two superoxide dismutases from the protozoan parasite *Perkinsus marinus*. *Acta*

Crystallographica Section F Structural Biology and Crystallization Communications, 62(11): 1072-1075.

Aubusson-Fleury, A.; Bricheux, G.; Damaj, R.; Lemullois, M.; Coffe, G.; Donnadieu, F.; Koll, F.; Viguès, B. & Bouchard, P. (2013). Epiplasmins and epiplasm in *Paramecium*: the building of a submembraneous cytoskeleton. *Protist*, 164(4): 451-469.

Ayo, B.; Santamaria, E.; Latatu, A.; Artolozaga, I.; Azua, I.; Iriberry, J. (2001). Grazing rates of diverse morphotypes of bacterivorous ciliates feeding on four allochthonous bacteria. *Letters in Applied Microbiology*, 33: 455-460.

Azad, I. S.; Al-Marzouk, A.; James, C. M.; Almatar, S. & Al-Gharabally, H. (2007). Scuticociliatosis-associated mortalities and histopathology of natural infection in cultured silver pomfret (*Pampus argenteus* Euphrasen) in Kuwait. *Aquaculture*, 262(2-4): 202-210.

Babiak, I.; Brzuska, E. & Perkowski J. (2000). Fractional factorial design of screening experiments on cryopreservation of fish sperm. *Aquaculture Research*, 31: 273-282.

Baneyx, F. (1999). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology*, 10: 411-421.

Bannister, W. H.; Bannister, J. V.; Barra, B.; Bond, J. & Bossa, F. (1991). Evolutionary aspects of superoxide dismutases: the copper/zinc enzyme. *Free Radical Research Communications*, 12-13: 349-361.

Bannon, G. A.; Perkins-Dameron, R. & Allen-Nash, A. (1986). Structure and Expression of Two Temperature-Specific Surface Proteins in the Ciliated Protozoan *Tetrahymena thermophila*. *Molecular and cellular biology*, 6(9): 3240-3245.

Barnett, A. & Steers, E. (1984). Antibody-induced membrane fusion in *Paramecium*. *Journal of cell science*, 65: 153-162.

Barra, D.; Schinina, M. E.; Bossa, F.; Paget, K.; Durosay, P.; Guissani, A. & Michelson, A. M (1990). A tetrameric ion superoxide dismutase from the eukaryote *Tetrahymena pyriformis*. J Biol Chem., 265: 17680-17687.

Bartosz, G. (2005). "Superoxide Dismutases and Catalase" (pp. 109-149) en The Handbook of Environmental Chemistry (ed: Hutzinger, O.). Springer. Berlín. Alemania.

Bastiaens, G. J.; van Meer, M. P.; Scholzen, A.; Obiero, J. M.; Vatanashenassan, M.; van Grinsven, T.; Sim, B. K.; Billingsley, P. F.; James, E. R.; Gunasekera, A.; Bijker, E. M.; van Gemert, G. J.; van de Vegte-Bolmer, M.; Graumans, W.; Hermesen, C. C.; de Mast, Q.; van der Ven, A. J.; Hoffman, S. L. & Sauerwein, R. W. (2016). Safety, immunogenicity and protective efficacy of intradermal immunization with aseptic, purified, cryopreserved *Plasmodium falciparum* sporozoites in volunteers under chloroquine prophylaxis: A randomized controlled trial. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 94(3): 663-673.

Battistoni, A.; Pacello, F.; Folcarelli, S.; Ajello, M.; Donnarumma, G.; Greco, R.; Ammendolia, M. G.; Touati, D.; Rotilio, G. & Valenti, P. (2000). Increased expression of periplasmic Cu; Zn superoxide dismutase enhances survival of *Escherichia coli* invasive strains within nonphagocytic cells. Infection and Immunity, 68(1): 30-37.

Baust, J. G.; Gao, D. G. & Baust J. M. (2009). Cryopreservation. An emerging paradigm change. Cryogenesis, 5: 90-96.

Beaver, J. R. & Crisman, T. L. (1982). The trophic response of ciliated protozoans in freshwater lakes. Limnology and Oceanography, 27: 246-253.

Bécuwe, P.; Gratepanche, S.; Fourmaux, M. N.; Van Beeumen, J.; Samyn, B.; Mercereau-Puijalon, O.; Touzel, J. P.; Slomianny, C.; Camus, D. & Dive, D. (1996). Characterization of iron-dependent

endogenous superoxide dismutase of *Plasmodium falciparum*. Molecular and Biochemical Parasitology, 76(1-2): 125-134.

Behrens, A.; Heller, M.; Kirchhoff, H.; Yogev, D. & Rosengarten, R. (1994) A family of phase- and size-variant membrane surface lipoprotein antigens (Vsps) of *Mycoplasma bovis*. Infection and Immunity, 62(11): 5075-5084.

Benwitz G. (1984). Die Entladung der Haptocysten von *Ephelota gemmipara* (Suctoria, Ciliata). Zeitschrift fuer Naturforschung C, 39:812-817.

Beyer, W.; Imlay, J. & Fridovich I. (1991). Superoxide dismutases. Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology, 40: 221-253.

Blanco, E.; Cubillos, C.; Moreno, N.; Bárcena, J.; de la Torre, B. G.; Andreu, D. & Sobrino, F. (2013). B epitope multiplicity and B/T epitope orientation influence immunogenicity of foot-and-mouth disease peptide vaccines. Clinical and Developmental Immunology: 1-9.

Blanco-Abad V, Noia M, Valle A, Fontenla F, Folguesta I, De Felipe AP, Pereiro P, Leiro J, Lamas J. (2018). The coagulation system helps control infection caused by the ciliate parasite *Philasterides dicentrarchi* in the turbot *Scophthalmus maximus* (L.). Developmental & Comparative Immunology, 87:147-156.

Booth, K. S.; James, E. R. & Popiel, I. (1996). Cryopreservation of an attenuated vaccine strain of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. Cryobiology, 33(3): 330-337.

Boucher.; I. W.; Brzozowski.; A. M.; Brannigan.; J. A.; Schnick.; C.; Smith.; D. J.; Kyes.; S. A.; & Wilkinson.; A. J. (2006). The crystal structure of superoxide dismutase from *Plasmodium falciparum*. BMC Structural Biology, 6(20): 1-10.

Bourne, Y.; Redford, S. M.; Steinman, H. M.; Lepock, J. R.; Tainer, J. A. & Getzoff, E. D. (1996). Novel dimeric interface and electrostatic recognition in bacterial Cu, Zn superoxide dismutase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93: 12774–12779.

Bowden, T. J.; Menoyo-Luque, D.; Bricknell, I. R. & Wergeland H. (2002). Efficacy of different administration routes for vaccination against *Vibrio anguillarum* in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Fish and Shellfish Immunology*, 12: 283-285.

Bowman, G. R.; Elde, N. C.; Morgan, E.; Winey, M. & Turkewitz, A. (2005a). Core formation and the acquisition of fusion competence are linked during secretory granule maturation in *Tetrahymena*. *Traffic*, 6(4): 303-323.

Bowman, G. R.; Smith, D. G. S.; Siu, K. W. M.; Pearlman, R. E. & Turkewitz, A. (2005b). Genomic and proteomic evidence for a second family of dense core granule cargo proteins in *Tetrahymena thermophila*. *Journal of eukaryotic microbiology*, 52(4): 291-297.

Bowman, K. & Leong, W. K. (2006). Chitosan nanoparticles for oral drug and gene delivery. *International Journal of Nanomedicine*, 1(2): 117–128.

Broadway, N. (2012). Recombinant Protein Expression: Vector-Host Systems. *Methods*, 2: 123.

Broxton, C. N. & Culotta, V. C. (2016). An Adaptation to Low Copper in *Candida albicans* Involving SOD Enzymes and the Alternative Oxidase. *PLoS One*, 11(12): 1-16.

Budiño, B.; Lamas, J.; González, A.; Pata, M. P.; Devesa, S.; Arranz, J.A & Leiro, J. (2011a). Coexistence of several *Philasterides dicentrarchi* strains on a turbot fish farm. *Aquaculture*, 322-323: 23-32.

Budiño, B.; Lamas, J.; Pata, M. P.; Arranz, J. A.; Sanmartín, M. L. & Leiro, J. (2011b) Intraspecific variability in several isolates of

Philasterides dicentrarchi (syn. *Miamiensis avidus*), a scuticociliate parasite of farmed turbot. Veterinary Parasitology. Veterinary Parasitology, 175: 260–272.

Budiño, B.; Leiro, J.; Cabaleiro, S. & Lamas, J. (2012). Characterization of *Philasterides dicentrarchi* isolates that are pathogenic to turbot: Serology and cross-protective immunity. Aquaculture, 364-365: 130-136.

Buonanno, F. & Ortenzi, C. (2015). Cold-shock based method to induce the discharge of extrusomes in ciliated protists and its efficiency. Journal of basic microbiology, 56: 586-590.

Burgos-Aceves, M. A.; Cohen, A.; Smith, Y. & Faggio, C. (2016). Estrogen regulation of gene expression in the teleost fish immune system. Fish and Shellfish Immunology, 58: 42-49.

Bustin, S. A.; Benes, V.; Garson, J. A.; Hellemans, J.; Huggett, J.; Kubista, M.; Mueller, R.; Nolan, T.; Pfaffl, M. W.; Shipley, G. L.; Vandesompele, J. & Wittwer, C. T. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. Clinical Chemistry, 55(4): 611-622.

Capdeville, Y.; Cardoso de Almeida, M. L. & Deregnaucourt, C. (1978). The membrane-anchor of *Paramecium* temperature-specific surface antigens is a glycosylinositol phospholipid. Biochemical and Biophysical Research Communications, 147: 1219-1225.

Caplan, S.; Green, R.; Rocco, J & Kurjan, J. (1991). Glycosylation and structure of the yeast MF α 1 α -factor precursor is important for efficient transport through the secretory pathway. Journal of Bacteriology, 173(2): 627-635.

Caron, F. & Meyer, E. (1989). Molecular basis of surface antigen variation in paramecia. Annual review of microbiology, 43: 23-32.

Carroll, E. C.; Jin, L.; Mori, A.; Muñoz-Wolf, N.; Oleszycka, E.; Moran, H.B.T.; Mansouri, S.; McEntee, C. P.; Lambe, E.; Agger, M.; Andersen, P.; Cunningham, C.; Hertzog, P.; Fitzgerald, K. A.; Bowie, A.G. & Lave, E. C. (2016). The Vaccine Adjuvant Chitosan Promotes Cellular Immunity via DNA Sensor cGAS-STING-Dependent Induction of Type I Interferon. *Immunity*, 44(3): 597–608.

Castro, L. A. M.; da Silva-Neto, I. D. & da Silva-Paiva, T. (2016). Physiological reorganization in the hypotrich ciliate *Apoamphisiella vernalis* (Protista, Ciliophora, Hypotricha). *Iheringia, Serie Zoológica*, 107: 1-7.

Catcoparco, C.; Dupré, E. & Espinoza, C. (2010). Criopreservación de espermatozoides de anchoveta peruana (*Engraulis ringens*). *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 45(1): 121-126.

Cereghino, J. L. & Cregg, J. M. (2000). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Reviews*, 24 (1): 45-66.

Chang, H.; Li, X.; Teng, Y.; Liang, Y.; Peng, B.; Fang, F. & Chen, Z. (2010). Comparison of Adjuvant Efficacy of Chitosan and Aluminum Hydroxide for Intraperitoneally Administered Inactivated Influenza H5N1 Vaccine. *DNA and Cell Biology*, 29(9): 563–568.

Chaves-Pozo, E.; Muñoz, P.; López-Muñoz, A.; Pelegrín, P.; García Ayala, A.; Mulero, V. & Meseguer, J. (2005). Early innate immune response and redistribution of inflammatory cells in the bony fish gilthead seabream experimentally infected with *Vibrio anguillarum*. *Cell Tissue Research*, 320: 61-68.

Chen, F.; Xue, Y.; Pan, N.; Bhatti, M. Z.; Niu, T. & Chen, J. (2018). New contribution to the morphology and molecular mechanism of *Euplotes encysticus* encystment. *Scientific reports*, 8: 1-10.

Chen, K.; McAleer, J. P.; Lin, Y.; Paterson, D. L.; Zheng, M.; Alcorn, J. F.; Weaver, C. T. & Kolls, J. K. (2011). Th17 Cells Mediate Clade-

Specific, Serotype-Independent Mucosal Immunity. *Immunity*, 35: 997–1009.

Chen, N.; Upcroft, J. A. & Upcroft, P. A. (1995). *Giardia duodenalis* gene encoding a protein with multiple repeats of a toxin homologue. *Parasitology*, 111:423-431.

Cheng, C. A.; John, J. A.; Wu, M. S.; Lee, C. Y.; Lin, C. H. & Chang, C. Y. (2006). Characterization of serum immunoglobulin M of grouper and cDNA cloning of its heavy chain. *Veterinary Immunology Immunopathology*, 10: 255-265.

Chichili, V. P. R.; Kumar, V. & Sivaraman, J. (2013). Linkers in the structural biology of protein-protein interactions. *Protein Science*, 22: 153-167.

Chilcoat, N. D.; Melia, S. M.; Haddad, A. & Turkewitz, A. (1996). Granule lattice protein 1 (Gr1P), an acidic, calcium-binding protein in *Tetrahymena thermophila* dense-core secretory granules, influences granule size, shape, content organization, and release but not protein sorting or condensation. *The journal of cell biology*, 135(6-2): 1775-1787.

Choi, D. H.; Na, B. K.; Seo, M. S.; Song, H. R. & Song, C. Y. (2000). Purification and characterization of iron superoxide dismutase and copper-zinc superoxide dismutase from *Acanthamoeba castellanii*. *Journal of Parasitology*, 86: 899-907.

Ciabattini, A.; Pettini, E.; Fiorino, F.; Pastore, G.; Andersen, P.; Pozzi, G. & Medaglini, D. (2016). Modulation of Primary Immune Response by Different Vaccine Adjuvants. *Frontiers in Immunology*; 7: 427-439.

Citti, C. & Rosengarten, R. (1997). Mycoplasma genetic variation and its implication for pathogenesis. *The Wiener Klinische Wochenschrift*, 109: 562-568.

Clark, T. & Forney, J., (2003). "Free-living and parasitic ciliates" (pp. 387-402) en *Antigenic Variation*. Academic Press (ed. Craig, A. & Sherf, A). Elsevier Science Ltd., London, England.

Clark, T.G.; Lin, T. L.; Jackwood, D. A.; Sherrill, J.; Lin, Y. & Dickerson H. W. (1999). The gene for an abundant parasite coat protein predicts tandemly repetitive metal binding domains. *Gene*, 229:91-100.

Clark, T. G.; Lin, T. L. & Dickerson, H. W. (1996). Surface antigen cross-linking triggers forced exit of a protozoan parasite from its host. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93: 6825-6829.

Clark, T. G.; Lin, T. L. & Dickerson, H. W. (1995). Surface immobilization antigens of *Ichthyophthirius multifiliis*: their role in protective immunity. *Annual Review of Fish Diseases*, 5: 113-131.

Claros, M. G. P. & Vincens, P. (1996). Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. *European Journal of Biochemistry*, 241, 779-786.

Collins, T. & Wilhelm, J. M. (1981). Post-translational cleavage of mucocysts precursors in *Tetrahymena*. *The Journal of Biological Chemistry*, 256(20): 10475-10484.

Corfield, A. P. & Berry, M. (2015). Glycan variation and evolution in the eukaryotes. *Trends in Biochemical Sciences*, 40:351-359.

Corfield, A. P. (2015) Mucins: a biologically relevant glycan barrier in mucosal protection. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1850: 236-252.

Cowan, A. T.; Bowman, G. R.; Edwards, K. F.; Emerson, J. J. & Turkewitz, A. (2005). Genetic, genomic, and functional analysis of the granule lattice proteins in *Tetrahymena* secretory granules. *Molecular Biology of the Cell*, 16: 4046-4060.

Crapo, J. D.; Oury, T.; Rabouille, C.; Slot, J. W. & Chang, L. Y. (1992). Copper/zinc superoxidedismutase is primarily a cytosolic protein in hu

man cells. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 89(21): 10405-10409.

Cruz, P. E.; Medina, V. M. & Velasco, Y. M. (2006). Evaluación de diferentes crioprotectores para la crioconservación de espermatozoides de yamú (*Brycon amazonicus*). Revista colombiana de ciencias pecuarias, 19(2): 152-159.

Cuesta, A.; Rodríguez, A.; Salinas, I.; Meseguer, J. & Esteban, M. A. (2007). Early local and systemic innate immune responses in the teleost gilthead seabream after intraperitoneal injection of whole yeast cells. Fish and Shellfish Immunology, 22: 242-451.

Day, J. G. (2004). Cryopreservation: fundamentals, mechanisms of damage on freezing/thawing and application in culture collections. Nova Hedwigia, 79: 191-205.

De Felipe, A. P. Tesis doctoral. Resolución de la sinonimia *Philasterides dicentrarchi*/*Miamiensis avidus*. Caracterización genética, serológica y bioquímica de los aislados de *P. dicentrarchi*. Directores: Leiro, J. M. y Lamas, J. Instituto de Investigaciones y Análisis Alimentarias, Departamento de Parasitología, Universidad de Santiago de Compostela, España, 2018.

De Felipe, A. P.; Lamas, J.; Sueiro, R. A.; Folgueira, I. & Leiro, J. M. (2017). New data on flatfish scuticociliatosis reveal that *Miamiensis avidus* and *Philasterides dicentrarchi* are different species. Parasitology, 28: 1-18.

De Paoli (2005). Biobanking in microbiology: From sample collection to epidemiology, diagnosis and research. FEMS Microbiology Reviews, 29: 897-910.

De Rezende, J.; Rangel, C. P.; McIntosh, D.; Silveira, J. A. G.; Cunha, N. C.; Ramos, C. A. N. & Fonseca, A. H. (2015). *In vitro* cultivation and cryopreservation of *Babesia bigemina* sporokinets in hemocytes of *Rhipicephalus microplus*. Veterinary Parasitology, 212: 400-403.

Deitsch, K. W.; Lukehart, S. A. & Stringer, J. R. (2009). Common strategies for antigenic variation by bacterial, fungal and protozoan pathogens. *Nature Reviews Microbiology*, 7: 493-503.

Desideri, A. K. & Falconi, M. (2003). Prokaryotic Cu,Zn superoxide dismutases. *Biochemical Society Transactions*, 31(6):1322-1325.

Dickerson, H. W. & Findly, R. C. (2014). Immunity to *Ichthyophthirius* infections in fish: A synopsis. *Developmental and Comparative Immunology*, 43: 290–299.

Dickerson, H. W. & Clark, T. G. (1998). *Ichthyophthirius multifiliis*: a model of cutaneous infection and immunity in fishes. *Immunological Reviews* 166: 377-384.

Dickerson, H. W. & Clark, T. G. (1993). Immune response of fishes to ciliates. *Annual Review of Fish Diseases*, 6:107-120.

Do Vale, A.; Afonso, A. & Silva, M. T. (2002). The professional phagocytes of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): cytochemical characterisation of neutrophils and macrophages in the normal and inflamed peritoneal cavity. *Fish Shellfish Immunology*, 13: 183-198.

Doerder, F. P. & Gerber, C. A. (2000). Molecular characterization of the SerL paralogs of *Tetrahymena thermophila*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 278:621-626.

Dolan, J. R. (1991). Microphagous ciliates in mesohaline Chesapeake Bay waters: estimates of growth rates and consumption by copepods. *Marine Biology*, 111: 303-309.

Dragesco, A.; Dragesco, J.; Coste, F.; Gasc, C.; Romestand, B.; Raymond, J. C. & Bouix, G. (1995). *Philasterides dicentrarchi*, n. sp., (ciliophora, scuticociliatida), a histophagous opportunistic parasite of *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758), a reared marine fish. *European Journal of Protistology*, 31(3): 327–340.

Dupré, E. & Joo, R. (2006). Viabilidad de espermatozoides criopreservados de macha *Mesodesma donacium* (Mollusca, Bivalvia). *Investigación marina Valparaíso*, 34(2): 187-190.

Duraisingh, M. T. (2016). Infection of laboratory colonies of *Anopheles* mosquitoes with *Plasmodium vivax* from cryopreserved clinical isolates. *International Journal for Parasitology*, 46(11): 679-683.

Ellis, A. E. (2001). Innate host defence mechanism of fish against viruses and bacteria. *Developmental and Comparative Immunology*, 25: 827-839.

Emery, S. J.; van Sluyter, S. & Haynes, P. A. (2014). Proteomic analysis in *Giardia duodenalis* yields insights into strain virulence and antigenic variation. *Proteomics*, 14(21-22): 2523-2534

Engström, H. A.; Andersson, P. O. & Ohlson, S. (2005). Analysis of the specificity and thermodynamics of the interaction between low affinity antibodies and carbohydrate antigens using fluorescence spectroscopy. *Journal of Immunological Methods*, 297: 203–211.

Estévez, J.; Leiro, J.; Santamarina, M. T. & Ubeira, F.M. (1995). A sandwich immunoassay to quantify low levels of turbot (*Scophthalmus maximus*) immunoglobulins. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 45(1-2): 165-174.

Everett, K. D. E.; Knight, J. R. & Dickerson, H. W. (2002). Comparing tolerance of *Ichthyophthirius multifiliis* and *Tetrahymena thermophile* for new cryopreservation methods. *Journal Protozoology*, 88: 41-46.

Fan, X. & Mattheis, J. P. (2006). Inhibition of oxidative and antioxidative enzymes by trans-resveratrol. *Journal of Food Science*, 66: 200-203.

Fankhauser, N.; Nguyen-Ha, T. M.; Adler, J. & Mäser, P. (2007). Surface antigens and potential virulence factors from parasites detected

by comparative genomics of perfect amino acid repeats. *Proteome Science*, 5 (20): 1-9.

Fattman, C. L.; Schaefer, L. M. & Oury, T. D. (2003). Extracellular superoxide dismutase in biology and medicine. *Free Radical Biology and Medicine*, 35: 236-256.

Fenchel, T. (1968). The ecology of marine macrobenthos. II. The food of marine benthic ciliates. *Ophelia*, 5: 73-121.

Fenchel, T. (1990). Adaptive significance of polymorphic life cycles in Protozoa: responses to starvation and refeeding in two species of marine ciliates. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 136(3): 159-177.

Fenchel, T.; Kristensen, L. D. & Rasmussen, L. (1990). Water column anoxia: vertical zonation of planktonic protozoa. *Marine Ecology Progress Series*, 62: 1-10.

Feng, L.; Miao, W. & Wu, Y. (2007). Differentially expressed genes of *Tetrahymena thermophila* in response to tributyltin (TBT) identified by suppression subtractive hybridization and real time quantitative PCR. *Aquatic toxicology*, 81: 99-105.

Fernández-Casal, J. y Rodríguez, J. L. (2008). Evolución del cultivo del rodaballo (*Scophthalmus maximus*) en los últimos 10 años (1998-2007). X Foro dos Recursos Mariños e Acuicultura das Rias Galegas, Santiago de Compostela, 171-176.

Ferro, D.; Franchi, N.; Bakiu, R.; Ballarin, L. & Santovito, G. (2018). Molecular characterization and metal induced gene expression of the novel glutathione peroxidase 7 from the chordate invertebrate *Ciona robusta*. *Comparative Biochemistry & Physiology*, 205: 1-7.

Ferro, D.; Bakiu, R.; De Pittà, C.; Boldrin, F.; Cattalini, F.; Pucciarelli, S.; Miceli, C. & Santovito, G. (2015). Cu,Zn superoxide dismutases from *Tetrahymena thermophila*: molecular evolution and gene

expression of the first line of antioxidant defenses. *Protist.*, 166(1):131-145.

Ferro, K.; Ferro, D.; Corrá, F.; Bakiu, R.; Santovito, G. & Kurtz, J. (2017). Cu,Zn SOD genes in *Tribolium castaneum*: evolution, molecular characterisation and gene expression during immune priming. *Frontiers of Immunology*, 18(8): 1-11.

Filep, J. G. & El Kebir, D. (2009). Neutrophil apoptosis: a target for enhancing the resolution of inflammation. *Journal Cell Biochemistry*, 108: 1039-1046.

Fischer, R.; Stoger, E.; Schillberg, S.; Christou, P. & Twyman, R. M. (2004). Plant-based production of biopharmaceuticals. *Current Opinion in Plant Biology*, 7 (2): 152-158.

Fonseca, J. A.; Cabrera-Mora, M.; Kashentseva, E. A.; Villegas, J. P.; Fernandez, A.; Van Pelt, A.; Dmitriev, I. P.; Curiel, D. T. & Moreno, A. (2016). A *Plasmodium* promiscuous T cell epitope delivered within the Ad5 hexon protein enhances the protective efficacy of a protein based malaria vaccine. *PLoS One*, 11(4): 1-26.

Fontecha, J.; Requena, T. & Swaisgood, H. E. (1996). Affinity chromatography of proteinases using bacitracin immobilized to porous glass beads. *Letters in Applied Microbiology*, 22: 371-374.

Fontenla, F.; Abad-Blanco, V.; Pardo, B. G.; Folgueira, I.; Noia, M.; Gómez Tato, A.; Martínez, P.; Leiro, J. M. & Lamas, J. (2016). Vaccine-induced modulation of gene expression in turbot peritoneal cells. A microarray approach. *Molecular Immunology*, 75: 188-199.

Forney, J. D.; Epstein, L. M.; Preer, L. B.; Rudman, B. M.; Widmayer, D. J.; Klein, W. H. & Preer, J. R. (1983). Structure and expression of genes for surface proteins in *Paramecium*. *Molecular and Cellular Biology*, 3: 466-474.

Fujii, M.; Ishii, N.; Joguchi, A.; Yasuda, K. & Ayusawa, D. (1998). A novel superoxide dismutase gene encoding membranebound and extracellular isoforms by alternative splicing in *Caenorhabditis elegans*. DNA Research, 5(1): 25-30.

Fulton, J. D. & Smith, A. V. (1953). Preservation of *Entamoeba histolytica* at -79°C in the presence of glycerol. Annals of Tropical Medicine and Parasitology, 47: 240-246.

Fyda, J. (1998). Predator-induced morphological changes in the ciliate *Colpidium* (Protozoa, Ciliophora). European Journal of Protistology, 34: 111-117.

Fyde, J.; Kennaway, G.; Adams, K. & Warren, A. (2006). Ultrastructural events in the predator-induced defence response of *Colpidium kleini* (Ciliophora: Hymenostomatia). Acta Protozoologica, 45: 461-464.

Gäbler-Schwarz, S.; Rad-Menéndez, C.; Achilles-Day, U. E. M.; Campbell, C. N. & Day, J. G. (2013). Cryopreservation of *Phaeocystis Antarctica*. CryoLetters, 34: 561-570.

Garofalo, R. S. & Satir, B. H. (1984) *Paramecium* secretory granule control: quantitative studies on *in vitro* expansion and its regulation by calcium and pH. Journal of Cell Biology, 99: 2193-2199.

Garzón, D. L.; Peñaranda, D. S.; Pérez, L.; Marco-Jiménez, F.; Espert, X.; Müller, T.; Jover, M. & Asturiano, J. F. (2008). Effects of pH, sodium bicarbonate, cryoprotectants and foetal bovine serum on cryopreservation of european eel sperm. Reproduction in Domestic Animal, 43: 99-105.

Gasteiger, E.; Hoogland, C.; Gattiker, A.; Duvaud, S.; Wilkins, M.R.; Appel, R.D. & Bairoch A. (2005). "Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server" (pp. 571-607) en The Proteomics Protocols Handbook (ed. J. M. Walker). Humana Press. Nueva Jersey, Estados Unidos.

Gautier, M. C.; Garreau de Lombresse, N. & Madeddu, L. (1994). Evidence for defects in membrane traffic in *Paramecium* secretory mutants unable to produce functional storage granules. *Journal of Cell Biology*, 124: 893-902.

Gellissen, G. & Hollenberg, C. P. (1997). Application of yeasts in gene expression studies: a comparison of *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha* and *Kluyveromyces lactis* – a review. *Gene*, 190: 87-97.

Gellissen, G. (2000). Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54 (6): 741-750.

Gerber, C. A.; Lopez, A. B.; Shook, S. J. & Doerder, F. P. (2002). Polymorphism and selection at the SerH immobilization antigen locus in natural populations of *Tetrahymena thermophila*. *Genetics*, 160: 1469–1479.

Gershoni-Yahalom, O.; Landes, S.; Kleiman-Shoval, S.; Ben-Nathan, D.; Kam, M.; Lachmi, B. E.; Khinich, Y.; Simanov, M.; Samina, I.; Eitan, A.; Cohen, I. R.; Rager-Zisman, B. & Porgador, A. (2010). Chimeric vaccine composed of viral peptide and mammalian heat-shock protein 60 peptide protects against West Nile virus challenge. *Immunology*, 130(4): 527-53.

Giddings, G.; Allison, G.; Brooks, D. & Carter, A. (2000). Transgenic plants as factories for biopharmaceuticals. *Nature Biotechnology*, 18 (11): 1151-1155.

Gilligan D. M. & Satir, B. H. (1983). Stimulation and inhibition of secretion in *Paramecium*: role of divalent cations. *Journal of Cell Biology*, 97: 224-234.

Gillin, F. D.; Hagblom, P.; Harwood, J.; Aley, S. B.; Reiner, D. S.; McCaffery, M.; So, M. & Giuney, D. G. (1990). Isolation and

expression of the gene for a major surface protein of *Giardia lamblia*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 87: 4463-4467.

Glas-Albrecht, R.; Németh, A. & Plattner, H. (1990). Secretory proteins and glycoproteins from *Paramecium* cells. European Journal of Protistology, 26:149-159.

Goldberg, T.; Hecht, M.; Hamp, T.; Karl, T.; Yachdav, G.; Ahmed, N.; Altermann, U.; Angerer, P.; Ansorge, S.; Balasz, K.; Bernhofer, M.; Betz, A.; Cizmadija, L.; Do, K. T.; Gerke, J.; Greil, R.; Joerdens, V.; Hastreiter, M.; Hembach, K.; Herzog, M.; Kalemanov, M.; Kluge, M.; Meier, A.; Nasir, H.; Neumaier, U.; Prade, V.; Reeb, J.; Sorokoumov, A.; Troshani, I.; Vorberg, S.; Waldrapp S.; Zierer, J.; Nielsen, H. & Rost, B. (2014). LocTree3 prediction of localization. Nucleic Acids Res., 42: 350-355.

Goldstein, J. I.; Yakowitz, H. & Newbury, D. E. (1977). Cap. 1 "Introduction" (pp. 1-2) en Practical scanning electron microscopy: electron and ion microprobe análisis (ed. Goldstein, J. I. & Yakowitz, H.). Plenum Press. New York (EEUU) and London (UK).

Golvano, J.; Lasarte, J. J.; Sarobe, P.; Gullón, A.; Prieto, J. & Borrás-Cuesta, F. (1990). Polarity of immunogens: implications for vaccine design. European Journal of Immunology, 20: 2363-2366.

González-Díaz, H.; Pérez-Montoro, L. & Ubeira, F. M. (2014). Model for Vaccine Design by Prediction of B-Epitopes of IEDB Given Perturbations in Peptide Sequence, *In Vivo* Process, Experimental Techniques, and Source or Host Organisms. Journal of Immunology Research, 2014: 1-15.

González-Miguel, J.; Morchón, R.; Mellado, I.; Carretón, E.; Montoya-Alonso, J. A. & Simón, F. (2011). Excretory/secretory antigens from *Dirofilaria immitis* adult worms interact with the host fibrinolytic system involving the vascular endothelium. Molecular & Biochemical Parasitology, 181: 134-140.

Görg, A.; Weiss, W. & Dunn, M. J. (2004). Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics*, 4: 3665-3685.

Gould, S. B.; Kraft, L. G.; van Dooren, G. G.; Goodman, C. D.; Ford, K. L.; Cassin, A. M.; Bacic, A.; McFadden, G. I. & Waller, R. F. (2010). Ciliate pellicular proteome identifies novel protein families characteristic repeat motifs that are common to alveolates. *Molecular Biology and Evolution*, 28(3): 1319-1331.

Gu, Y.; Sun, X.; Li, B.; Huang, J.; Zhan, B. & Zhu, X. (2017). Vaccination with a paramyosin-based multi-epitope vaccine elicits significant protective immunity against *Trichinella spiralis* infection in mice. *Frontiers in Microbiology*, 8(1475): 1-9.

Gwo, J. C.; Chiu, J. Y.; Chou, C. C. & Cheng, H. Y. (2005). Cryopreservation of a marine microalga, *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatophyceae). *Cryobiology*, 50 (3): 338-343.

Haacke-Bell, B.; Hohenberger-Bregger, R. & Plattner, H. (1990). Trichocysts of *Paramecium*: secretory organelles in search of their function. *European Journal of Protistology*, 25:289-305.

Haas, B. J.; Papanicolaou, A.; Yassour, M.; Grabherr, M.; Blood, P. D.; Bowden, J.; Couger, M. B.; Eccles, D.; Li, B.; Lieber, M.; MacManes, M. D.; Ott, M.; Orvis, J.; Pochet, N.; Strozzi, F.; Weeks, N.; Westerman, R.; William, T.; Dewey, C. N.; Henschel, R.; LeDuc, R. D.; Friedman, N. & Regev, A. (2013). De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. *Nature Protocols*, 8(8):1494-1512.

Halliwell, B. (1974). Superoxide dismutase.; catalase and glutathione peroxidase: solutions to the problems of living with oxygen. *New Phytologist*, 73: 1075-1086.

Halliwell, B. & Gutteridge, J. M. C. (1989). Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press. Oxford. Reino Unido.

Hamsten, C.; Westberg, J.; Bölske, G.; Aylin, R.; Uhlén, M. & Persson, A. (2008). Expression and immunogenicity of six putative variable surface proteins in *Mycoplasma mycoides subsp. mycoides*. *Microbiology*, 154: 539-549.

Hansma, H. G. & Kung, C. (1975). Studies on the cell surface of *Paramecium*. Ciliary membrane proteins and immobilization antigens. *Biochemistry Journal*, 152: 523-528.

Harikrishnan, R.; Balasundaram, C. & Heo, M. S. (2010). Scuticociliatosis and its recent prophylactic measures in aquaculture with special reference to South Korea taxonomy, diversity and diagnosis of scuticociliatosis. Part I. Control strategies of scuticociliatosis: Part II. Fish and Shellfish Immunology, 29: 15-31.

Hassan, H. M. (1989). Microbial superoxide dismutases. *Advances in Genetics*, 26: 65-97.

Hatanaka, A.; Umeda, N. & Hirazawa, N. (2008). Molecular cloning of a putative agglutination/immobilization antigen located on the surface of a novel agglutination/immobilization serotype of *Cryptocaryon irritans*. *Parasitology*, 135: 1043-1052.

Hatanaka, A.; Umeda, N.; Yamashita, S. & Hirazawa, N. (2007). Identification and characterization of a putative agglutination/immobilization antigen on the surface of *Cryptocaryon irritans*. *Parasitology*, 134: 1163-1174.

Hausmann, K. (1978). Extrusive organelles in protists. *International Review of Cytology*, 52: 197-276.

Hayward, B. H.; Droste, R. & Epstein, S. S. (2003). Interstitial ciliates: benthic microaerophiles or planktonic anaerobes? *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 50(5): 356-359.

Heffernan, M. J.; Zaharoff, D. A.; Fallon, J. K.; Schlom, J. & Greine, J. W. (2010). *In vivo* efficacy of a chitosan/IL-12 adjuvant system for protein-based vaccines. *Biomaterials*, 32: 926-932.

Hitzeman, R. A.; Hagie, F. E.; Levine, H. L.; Goeddel, D. V.; Ammerer, G. & Hall, B. D. (1981). Expression of a human gene for interferon in yeast. *Nature*, 293: 717-722.

Hong, Z.; Kosman, D. J.; Thakur, A.; Rekosh, D. & LoVerde, P. T. (1992). Identification and purification of a second form of Cu/Zn superoxide dismutase from *Schistosoma mansoni*. *Infection and Immunity*, 60(9): 3641-3651.

Huang, H. C.; Sherman, M. Y.; Kandrór, O. & Goldberg, A. L. (2001). The molecular chaperone DnaJ is required for the degradation of a soluble abnormal protein in *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*, 276: 3920-3928.

Hubálek, Z. (2003). Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology*, 46(3): 205-229.

Huelsenbeck, J. P. & Roquist, F. (2001). MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, 17: 754-755.

Hünseler, P.; Scheidgen-Kleyboldt, G. & Tiedtke, A. (1987). Isolation and characterization of a mutant of *Tetrahymena thermophila* blocked in secretion of lysosomal enzymes. *Journal of Cell Science*, 88:47-55.

Huse, K.; Böhme, H. & Scholz G. H. (2002). Purification of antibodies by affinity chromatography. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 51: 217-231.

Iglesias, R.; Paramá, A.; Álvarez, M. F.; Leiro, J.; Aja, C. & Sanmartín, M. L. (2003a). *In vitro* growth requirements for the fish pathogen *Philasterides dicentrarchi* (Ciliophora, Scuticociliatida). *Veterinary Parasitology*, 111: 19-30.

Iglesias, R.; Paramá, A.; Álvarez, M. F.; Leiro, J.; Ubeira, F. M. & Sanmartín, M. (2003b). *Philasterides dicentrarchi* (Ciliophora: Scuticociliatida) expresses surface immobilization antigens that probably induce protective immune responses in turbot. *Parasitology* 126: 125-134.

Iglesias, R.; Paramá, A.; Álvarez, M. F.; Leiro, J. M. & Sanmartín, M. L. (2002). Antiprotozoals effective *in vitro* against the scuticociliate fish pathogen *Philasterides dicentrarchi*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 49: 191-197.

Iglesias, R.; Paramá, A.; Alvarez, M. F.; Leiro, J.; Fernández, J. & Sanmartín, M. L. (2001). *Philasterides dicentrarchi* (Ciliophora, Scuticociliatida) as the causative agent of scuticociliatosis in farmed turbot *Scophthalmus maximus* in Galicia (NW Spain). *Diseases of Aquatic Organisms*, 46:47-55.

Iglesias, R.; Leiro, J.; Ubeira, F. M.; Santamarina, M. T. & Sanmartín, M- L. (1993). *Anisakis simplex*: antigen recognition and antibody production in experimentally infected mice. *Parasite Immunology*, 15:243-250.

Ishikawa, M.; Suzuki, M.; Nakamura, T.; Kishimoto, T.; Robertson, A.J. & Gusta, L.V. (2006). Effect of growth phase on survival of bromegrass suspension cells following cryopreservation and abiotic stresses. *Annals of Botany*, 97(3): 453-459.

James, E. R. (2004). Parasite cryopreservation by vitrification. *Cryobiology*, 49: 201-210.

James.; E. R. (1994). Superoxide dismutase. *Parasitology Today*, 10: 481-484.

Jaoko, W. G.; Lund, M.; Michael, E. & Simonsen, P. E. (2001). A simple and quick method for enhanced detection of specific IgE in serum from lymphatic filariasis patients. *Acta Tropica*, 80(1): 51-57.

Jansen, H. J.; Liem, M.; Jong-Raadsen, S. A.; Dufour, S.; Weltzien, F. A.; Swinkels, W.; Koelewijn, A.; Palstra, A.P.; Pelster, B.; Spaink, H. P.; Dirks, R. P. & Henkel, C. V. (2017). Rapid de novo assembly of the European eel genome from nanopore sequencing reads. *Scientific Reports*, 7:7213. Erratum in: *Scientific Reports*, (2019), 9: 7911.

Jee, B.; Kim, Y. & Park, M. S. (2001). Morphology and biology of parasite responsible for scuticociliatosis of cultured olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 47: 49-55.

Jiang, C.; Wei, W.; Yan, G.; Shi, T. & Miao, W. (2018). Transcriptome Analysis Reveals the Molecular Mechanism of Resting Cyst Formation in *Colpoda aspera*. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 0: 1-9.

Jørgensen, L.; Kania, P. K.; Rasmussen, K. J.; Mattsson, A. H.; Schmidt, J.; Al-Jubury, A.; Sander, A.; Salanti, A. & Buchmann, K. (2017). Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) immune response towards a recombinant vaccine targeting the parasitic ciliate *Ichthyophthirius multifiliis*. *Journal of Fish Diseases*; 1–7.

Joshi, P. & Dennis, P. P. (1993). Characterization of paralogous and orthologous members of the superoxide dismutase gene family from genera of the halophilic archaeobacteria. *Journal of Bacteriology*, 175(6): 1561–1571.

Kaba, S. A.; Price, A.; Zhou, Z.; Sundaram, V.; Schnake, P.; Goldman, I.F., Lal, A. A.; Udhayakumar, V. & Todd, C.W. (2008). Immune responses of mice with different genetic backgrounds to improved multiepitope, multitarget malaria vaccine candidate antigen FALVAC-1A. *Clinical and Vaccine Immunology*: 1674-1683.

Käll, L.; Krogh, A. & Sonnhammer, E. L. L. (2004). A Combined Transmembrane Topology and Signal Peptide Prediction Method. *Journal of Molecular Biology*, 338:1027-1036.

Kallerup, R. S. & Foged, C. (2015). “Classification of vaccines” (pp. 15-29) en *Subunit Vaccine Delivery*, (ed. Foged, C.; Rades, T. H.;

Perrie, Y. & Hook, S.). *Advances in Delivery Science and Technology*, Springer, New York, EEUU.

Kanematsu, S. & Asada, K. (1979). Ferric and manganic superoxide dismutases in *Euglena gracilis*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 195(2): 535-545.

Karakus, C.; Uslu, M.; Yazici, D. & Salih, B. A. (2016). Evaluation of immobilized metal affinity chromatography kits for the purification of histidine-tagged recombinant CagA protein. *Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1021: 182-187.

Kavran, J. M. & Leahy, D. J. (2014). Coupling antibody to cyanogen bromide-activated Sepahrose. *Methods Enzymology*, 541: 27-34.

Kedzierski, L.; Montgomery, J.; Bullen, D.; Curtis, J.; Gardiner, E.; Jimenez-Ruiz, A. & Handman, E. (2004). A leucine-rich repeat motif of *Leishmania* parasite surface antigen 2 binds to macrophages through the complement receptor 3. *Journal of Immunology*, 172: 4902-4906.

Keilin, D. (1959). The Leeuwenhoek lecture: The problem of anabiosis or latent life. History and current concept. *Proceedings of the Royal Society Biological Science*, 150: 149-191.

Kerboeuf, D. & Cohen, J. (1996). Inhibition of trichocyst exocytosis and calcium influx in *Paramecium* by amiloride and divalent cations. *Biology of the Cell*. 86:39-43.

Kim, T. S.; Jung, Y.; Na, B. K.; Kim, K. S. & Chung, P. R. (2000). Molecular cloning and expression of Cu/Zn containing superoxide dismutase from *Fasciola hepatica*. *Infection and Immunity*, 68(7): 3941-3948.

Kim, S. M.; Cho, J. B.; Kim, S. K.; Nam, Y. K. & Kim, K. H. (2004). Occurrence of scuticociliatosis in olive flounder *Paralichthys olivaceus*

by *Philasterides dicentrarchi* (Ciliophora: scuticociliatia). Diseases of Aquatic Organisms, 62: 2333–2338.

Kim, J. S.; Kim, H.; Yim, B.; Rhee, J-S.; Won, E-J. & Lee, Y-M (2018). Identification and molecular characterization of two Cu/Zn-SODs and Mn-SOD in the marine ciliate *Euplotes crassus*: Modulation of enzyme activity and transcripts in response to copper and cadmium. Aquatic Toxicology, 199: 296-304.

Ko, Y. G. & Thompson, G. A. (1992). Immobilization antigens from *Tetrahymena thermophila* are glycosyl-phosphatidylinositol-linked proteins. Journal of Protozoology, 39: 719-723.

Komal, F. & Asghar, F. (2016). Strategies for the engineering of recombinant protein and its high level expression. International Journal of Biochemistry Research & Review, 12(4): 1-10.

Kopple, K. D. (1972). Synthesis of cyclic peptides. Journal of Pharmaceutical Sciences, 61 (9): 1345-1356.

Krainer K.H. (1991). Contribution to the morphology, infraciliature and ecology of the planktonic ciliates *Strombidium pelagicum* n. sp., *Pelagostrombidium mirabile* (Penard, 1916) n. g. n. comb., and *Pelagostrombidium fullax* (Zacharias, 1876) n. g., n. comb. (Ciliophora, Oligotrichida). European Journal of Protistology, 27:60-70.

Krueger, T.; Fisher, P. L.; Becker, S.; Pontasch, S.; Dove, S.; Hoegh-Guldberg, O.; Leggat, W. & Davy, S. K. (2015). Transcriptomic characterization of the enzymatic antioxidants FeSOD; MnSOD; APX and KatG in the dinoflagellate genus *Symbiodinium*. BMC Evolutionary Biology, 15(48): 1-20.

Kugrens, P.; Lee, R. E. & Corliss, J. O. (1994). Ultrastructure, biogenesis and functions of extrusive organelles in selected non-ciliate protists. Protoplasma, 181: 164-190.

Kumar, S.; Stecher, G. & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular evolutionary genetic analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33: 1870-1874.

Kumar, P.; Chen, K. & Kolls, J. K. (2013). Th17 cell based vaccines in mucosal immunity. *Current Opinion in Immunology*, 25(3): 373-380.

Kusch, J. (1993). Induction of defensive morphological changes in ciliates. *Oecologia*, 94 (4): 571-575.

Kwon, S. R.; Kim, C. S. & Kim, K. H. (2003) Differences between short- and long-term cultures of *Uronema marinum* (Ciliophora: Scuticociliatida) in chemiluminescence inhibitory activity, antioxidative enzyme and protease activity. *Aquaculture*, 221: 107-114.

Lamas, J; Morais, P.; Arranz, J. A.; Sanmartín, M. L.; Orallo, F. & Leiro, J. (2009). Resveratrol promotes an inhibitory effect on the turbot scuticociliate parasite *Philasterides dicentrarchi* by mechanisms related to cellular detoxification. *Veterinary parasitology*, 161(3-4): 307-315.

Lamas, J.; Sanmartín, M; Parama, A., Castro, R.; Cabaleiro, S.; de Ocenda, M. & Leiro, J. (2008). Optimization of an inactivated vaccine against a scuticociliate parasite of turbot: effect of antigen, formalin and adjuvant concentration on antibody response and protection against the pathogen. *Aquaculture*, 278: 22-26.

Lee, E. H.; Kang, Y. J. & Kim, K. H. (2015). Survival of *Miamiensis avidus* (Ciliophora: Scuticociliatia) from antibody-dependent complement killing. *Journal of fish pathology*, 28(3): 171-174.

Lee, E. H. & Kim, K., H. (2011). Identification of differentially expressed genes in parasitic phase *Miamiensis avidus* (Ciliophora: Scuticociliatia) using suppression subtractive hybridization. *Diseases of Aquatic Organisms*, 94: 135-142.

Lee, E. H. & Kim, K. H. (2008). Can the surface immobilization antigens of *Philasterides dicentrarchi* (Ciliophora: Scuticociliatida) be used as target antigens to develop vaccines in cultured fish? *Fish and Shellfish Immunology*, 24: 142-146.

Lee, J. J.; Simborio, H. L.; Wehdnesday, A.; Reyes, B.; Kim, D. G.; Hop, H. T.; Min, W.; Her, M.; Jung, C. S.; Yoo, H. S. & Kim, S. (2015). Immunoproteomic identification of immunodominant antigens independent of the time of infection in *Brucella abortus* 2308-challenged cattle. *Veterinary Research*, 46 (17): 1-13.

Leid, R. W.; Suquet, C. M. & Tanigoshi, L. (1987). Parasite defense mechanisms for evasion of host attack: a review. *Veterinary Parasitology*, 25:147-162.

Leiro, J.; Arranz, J. A.; Iglesias, R.; Ubeira, F. M. & Sanmartín, ML. (2004). Effects of the histiophagous ciliate *Philasterides dicentrarchi* on turbot phagocyte responses. *Fish and Shellfish Immunology*, 17(1): 27-39.

León-Rodríguez, L.; Luzardo-Álvarez, A.; Blanco-Méndez, J.; Lamas, J. & Leiro, J. (2013). Biodegradable microparticles covalently linked to surface antigens of the scuticociliate parasite *P. dicentrarchi* promote innate immune responses *in vitro*. *Fish and Shellfish Immunology*, 34(1): 236-243.

León-Rodríguez, L.; Luzardo-Álvarez, A.; Blanco-Méndez, J.; Lamas, J. & Leiro, J. (2012). A vaccine based on biodegradable microspheres induces protective immunity against scuticociliatosis without producing side effects in turbot. *Fish & Shellfish Immunol*, 33: 21-27.

Lesser, M. P. (2006). Oxidative stress in marine environments: Biochemistry and Physiological Ecology. *Annual Review of Physiology*, 68: 253-278.

Lesser, M. P. (1996). Elevated temperatures and ultraviolet radiation cause oxidative stress and inhibit photosynthesis in symbiotic dinoflagellates. *Limnology and Oceanography*, 41: 271-283.

Li, S. C.; Kim, P. K. & Deber, C. M. (1995). Manipulation of peptide conformations by finetuning of the environment and/or the primary sequence. *Biopolymers*, 35: 667-675.

Li, X.S.; Min, M.; Du, N.; Gu, Y.; Hode, T.; Naylor, M.; Chen, D.; Nordquist, E. & Chen, W. (2013). Chitin, Chitosan, and Glycated Chitosan Regulate Immune Responses: The Novel Adjuvants for Cancer Vaccine. *Clinical and Developmental Immunology*, 2013: 1-8.

Liddell, S. & Knox, D. P. (1998). Extracellular and cytoplasmic Cu/Zn superoxide dismutases from *Haemonchus contortus*. *Parasitology*, 116(4): 383-394.

Lieschke G. & Trede, N. (2009). Fish Immunology. *Current Biology*, 19(16): 678-682.

Lilley, K. S.; Razzaq, A. & Dupree, P. (2001). Two-dimensional gel electrophoresis: recent advances in sample preparation, detection and quantitation. *Current Opinion in Chemical Biology*, 6:46-50.

Lin, T. L.; Clark, T. G. & Dickerson, H. W. (1996). Passive immunization of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) against the ciliated protozoan parasite *Ichthyophthirius multifiliis* by use of murine monoclonal antibodies. *Infection and Immunity*, 6: 4085-4090.

Lindblad, E. B. (2000). "Freund's adjuvants" (pp. 49-63) en *Methods in Molecular Medicine: Vaccine Adjuvants-Preparation Methods and Research Protocols* (Ed: O'Hagan, D.T.). Humana Press. Totowa, New Jersey. EE.UU.

Liu, L.; Huang, X.; Liu, J.; Li, W.; Ji, Y., Tian, D.; Tian, L.; Yang, X.; Xu, L.; Yan, R.; Li, X. & Song, X. (2017). Identification of common immunodominant antigens of *Eimeria tenella*, *Eimeria acervulina* and

Eimeria maxima by immunoproteomic analysis. *Oncotarget*, 8(21): 34935-34945.

Liu, X.; Zhang, H.; Gao, Y.; Zhang, Y.; Wu, H. & Zhang, Y. (2015). Efficacy of chitosan oligosaccharide as aquatic adjuvant administrated with a formalin-inactivated *Vibrio anguillarum* vaccine. *Fish and Shellfish Immunology*, 47: 855-860.

Loftus, B.; Anderson, I.; Davies, R.; Alsmark, U. C.; Samuelson, J.; Amedeo, P.; Roncaglia, P.; Berriman, M.; Hirt, R. P.; Mann, B. J.; Nozaki, T.; Suh, B.; Pop, M.; Duchene, M.; Ackers, J.; Tannich, E.; Leippe, M.; Hofer, M.; Bruchhaus, I.; Willhoeft, U.; Bhattacharya, A.; Chillingworth, T.; Churcher, C.; Hance, Z.; Harris, B.; Harris, D.; Jagels, K.; Moule, S.; Mungall, K.; Ormond, D.; Squares, R.; Whitehead, S.; Quail, M. A.; Rabinowitsch, E.; Norbertczak, H.; Priebe, C.; Wang, Z.; Guillén, N.; Gilchrist, C.; Stroup, S. E.; Bhattacharya, S.; Lohia, A.; Foster, P. G.; Sicheritz-Ponten, T.; Weber, C.; Singh, U.; Mukherjee, C.; El-Sayed, N. M.; Petri, W. A Jr.; Clark, C. G.; Embley, T. M.; Barrell, B.; Fraser, C. M. & Hall, N. (2005). The genome of the protist parasite *Entamoeba histolytica*. *Nature*, 433(7028):865-868.

Logan, M.; Law, J.; Ji-Xhin Wong, J. A.; Hockman, D.; Landi, A.; Chen, C.; Crawford, K.; Kundu, J.; Baldwin, L.; Johnson, J.; Dahiya, A.; LaChance, G.; Marcotrigiano, J.; Law, M.; Fong, S.; Tyrrell, L. & Houghton, M. (2016). Native folding of a recombinant gpE1/gpE2 heterodimer vaccine antigen from a 2 precursor protein fused with Fc IgG. *Journal of Virology*, 91(1): 1-13.

López-Romero, G.; Quintero, J.; Astiazarán-García, H. & Velázquez, C. (2015). Host defences against *Giardia lamblia*. *Parasite Immunology*, 37: 394-406.

Löwenadler, B.; Lycke, N.; Svanholm, C.; Svennerholm, A. M.; Krook, K. & Gidlund, M. (1992). T and B cell responses to chimeric proteins containing heterologous T helper epitopes inserted at different positions. *Molecular Immunology*, 29: 1185-1190.

Lozano, F. (2012). “Introducción al sistema inmunológico, sus principales elementos y la respuesta inmunitaria” (pp. 2453-2488) en Farreras Rozman. Medicina Interna (ed. Rozman, C. & Cardellach, F.), Elsevier, Barcelona, España.

Lushchak, V. I. (2016). Contaminant-induced oxidative stress in fish: a mechanistic approach. *Fish Physiology and Biochemistry*, 42(2): 711-747.

Lushchak, V. I. (2011). Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology*, 101: 13-30.

Ma, X.; Deng, D. & Chen, W. (2017). “Inhibitors and Activators of SOD, GSH-Px and CAT.” (pp. 207-224) en *Enzyme inhibitors and activators* (ed: Şentürk, M.). InTech. Rijeka. Croacia.

Maas, W. J. M.; de Graaf, I. A. M.; Schoen, E. D.; Koster, H. J.; Van de Sandt, J. J. M. & Groten, J. P. (2000). Assessment of some critical factors in the freezing technique for the cryopreservation of precision-cut rat liver slices. *Cryobiology*, 40: 250-263.

Madeddu, L.; Gautier, M. C.; Vayssié, L.; Houari, A. & Sperling, L. (1995). A large multigene family codes for the polypeptides of the crystalline trichocyst matrix in *Paramecium*. *Molecular Biology of the Cell*. 6: 649-659.

Madhavan, A. & Sukumaran, R. K. (2016) Secreted expression of an active human interferon-beta (HuIFN β) in *Kluyveromyces lactis*. *Engineering in Life Science*, 16: 379-385.

Maihle N. J. & Satir, B. H. (1986). Protein secretion in *Tetrahymena thermophila*. Characterization of the major proteinaceous secretory proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 261: 7566-7570.

Makrides, S. C. (1996). Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiological Reviews*, 60: 512–538.

Mallo, N.; Lamas, J.; De Felipe, A. P.; De Castro, M.; Sueiro, R. & Leiro, J. (2016). Presence of an isoform of H⁺-pyrophosphatase located in the alveolar sacs of a scuticociliate parasite of turbot: physiological consequences. *Parasitology*, 143: 576-587.

Mallo, N.; Lamas, J.; Piazzon, C. & Leiro J. M. (2015). Presence of a plant-like proton translocating pyrophosphatase in a scuticociliate parasite and its role as a possible drug target. *Parasitology*, 142: 449-462.

Mallo, N.; Lamas, J. & Leiro, J. M. (2013). Evidence of an alternative oxidase pathway for mitochondrial respiration in the scuticociliate *Philasterides dicentrarchi*. *Protist*. 164:824-36.

Manaa, A.; Mimouni, H.; Terras, A.; Chebil, F.; Wasti, S.; Gharbi, E. & Ben Ahmed, H. (2014). Superoxide dismutase isozyme activity and antioxidant responses of hydroponically cultured *Lepidium sativum* L. to NaCl stress. *Journal of Plant Interactions*, 9: 440-449.

Marco-Jiménez, F.; Garzón, D. L.; Peñaranda, D. S.; Pérez, L.; Viudes-de-Castro, M. P.; Vivente, J. S.; Jover, M. & Asturiano, J. F. (2006). Cryopreservation of European eel (*Anguilla Anguilla*) spermatozoa: Effect of dilution ratio, foetal bovine serum supplementation, and cryoprotectants. *Cryobiology*, 53: 51-57.

Marin, C.; Rodríguez-González, I. & Sánchez-Moreno, M. (2006). Identification of excreted iron superoxide dismutase for the diagnosis of *Phytomonas*. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 101: 649-654.

McArdle, E. W.; Bergquist, B. L. & Ehret, C. F. (1980). Structural Changes in *Tetrahymena rostrata* during Induced Encystment. *Journal of Protozoology*, 27: 388-397

Mehlotra, R. K. (1996). Antioxidant defense mechanisms in Parasitic Protozoa. *Critical Reviews in Microbiology*., 22: 295-314.

Mello, K.; Daly, T. M.; Long, C.A.; Burns, J. M. & Bergman, L.W. (2004). Members of the merozoite surface antigen 7 family with similar expression patterns differ in ability to protect against *Plasmodium yoelii* malaria. *Infection and Immunity*, 72: 1010-1018.

Mergulhao, F. J. M.; Summersb, D. K. & Monteiro, G. A. (2005). Recombinant protein secretion in *Escherichia coli*. *Biotechnology Advances*, 23: 177-202.

Mergulhao, F. & Monteiro, G. (2004). Secretion capacity limitations of the Sec pathway in *Escherichia coli*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 14: 128-133.

Miao, W.; Yu, T.; Orias, E.; Wan, M. & Fu, C. (2006). Identification of differentially expressed genes in *Tetrahymena thermophila* in response to dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) by suppression subtractive hybridization. *Environmental Microbiology*, 8 (6): 1122-1129.

Miller, A. (2012). Superoxide dismutases: ancient enzymes and new insights. *FEBS Letters*, 586: 585-595.

Misra, H. P. & Fridovich, I. (1978) Inhibition of superoxide dismutase by azide. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 189: 317-322.

Mitchell, A. L.; Attwood, T. K.; Babbitt, P. C.; Blum, M.; Bork, P.; Bridge, A.; Brown, S. D.; Chang, H-Y.; El-Gebali, S.; Fraser, M. I.; Gough, J.; Haft, D. R. , Huang, H.; Letunic, I.; Lopez, R.; Luciani, A.; Madeira, F.; Marchler-Bauer, A.; Mi H.; Natale, D. A.; Necci, M.; Nuka, G.; Orengo, C.; Pandurangan, A. P.; Paysan-Lafosse, T.; Pesseat, S.; Potter, S. C.; Qureshi, M. A.; Rawlings, N. D.; Redaschi, N.; Richardson, L. J. , Rivoire, C.; Salazar, G. A.; Sangrador-Vegas, A.; Sigrist, C. J.A.; Sillitoe, I.; Sutton, G. G.; Thanki, N.; Thomas P. D.; Tosatto, S. C. E. , Yong, S-Y. & Finn, R. D. (2019). InterPro in 2019: improving coverage, classification and access to protein sequence annotations. *Nucleic Acids Research*, 47: 351-360.

Mittra, B.; Laranjeira-Silva, M. F.; Miguel, D. C.; Perrone Bezerra de Menezes, J. & Andrews, N. W. (2017). The iron-dependent mitochondrial superoxide dismutase SODA promotes *Leishmania* virulence. *Journal of Biological Chemistry*, 292(29): 12324–12338.

Miyake, Y.; Karanis, P. & Uga, S. (2004). Cryopreservation of protozoan parasites. *Cryobiology*; 48: 1-7.

Miyake, A.; Buonanno, F.; Saltalamachia, P.; Masaki, M. E. & Lio, H. (2003). Chemical defence by means of extrusive cortical granules in the heterotrich ciliate *Climacostomun virens*. *European Journal of Protistology*, 39: 25-36.

Miyata, A. (1975). Cryo-preservation of the parasitic protozoa. *Japanese Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 3: 161-200.

Mo, Z.; Xu, S.; Cassidy-Hanley, D. M.; Li, Y.; Kolbin, D.; Fricke, J. M.; Li, A.; Clark, T. G. & Dan, X. (2019). Characterization and immune regulation role of an immobilization antigen from *Cryptocaryon irritans* on groupers. *Scientific reports*, 9(1029): 1-11.

Mo, Z.; Li, Y.; Wang, H.; Wnag, J.; Ni, L.; Yang, M.; Lao, G.; Luo, X.; Li, A. & Dan, X. (2016). Comparative transcriptional profile of the fish parasite *Cryptocaryon irritans*. *Parasites & Vectors*, 9(630): 1-12.

Modeo, L.; Petroni, G.; Bonaldi, M. & Rosati, G. (2001). Trichites of *Strombidium* (Ciliophora, Oligotrichida) are extrusomes. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 48:95-101.

Molloy, M. P. (2000). Two-dimensional electrophoresis of membrane proteins using immobilized pH gradients. *Analytical Biochemistry*, 280: 1-10.

Morais, E.A; de Carvalho Oliveira, J. A.; Melo, E. M.; Costa, M.A.F.; Nagem, R.A.P.; Russo, R.C.; Gomes, D. A. & de Goes, A.M. (2018). Efficacy of Chitosan as Vaccine Adjuvant Against

Paracoccidioidomycosis in Mice. *Journal of Immunology and Infectious Diseases*, 5(1): 1-16.

Morais, P.; Piazzon, C.; Lamas, J.; Mallo, N. & Leiro, J. M. (2013). Effect of resveratrol on oxygen consumption by *Philasterides dicentrarchi*, a scuticociliate parasite of turbot. *Protist*, 164(2): 206-217.

Morais, P.; Lamas, J.; Sanmartín, M. L.; Orallo, F. & Leiro J. (2009). Resveratrol induces mitochondrial alterations, autophagy and a cryptobiosis-like state in scuticociliates. *Protist*, 160(4): 552-564.

Morrison, H.G.; McArthur, A.G.; Gillin, F.D.; Aley, S.B.; Adam, R.D & Olsen, G.J. (2007). Genomic minimalism in the early diverging intestinal parasite *Giardia lamblia*. *Science*, 317: 1921–1926

Morton, C. L. & Potter, P., M. (2000). Comparison of *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Spodoptera frugiperda*, and COS7 cells for recombinant gene expression. *Molecular Biotechnology*, 16: 193-202.

Moustafa, E. M.; Tange, N.; Shimada, A. & Morita T. (2010). Experimental Scuticociliatosis in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) infected with *Miamiensis avidus*: pathological study on the possible neural routes of invasion and dissemination of the scuticociliate inside the fish body. *Journal of Veterinary and Medical Sciences*, 72(12): 1557-1563.

Müller, N. & Gottstein, B. (1998) Antigenic variation and the murine immune response to *Giardia lamblia*. *International Journal of Parasitology*, 28: 1829–1839.

Musoke, A.; Morzaria, S.; Nkonge, C.; Jones, E. & Nene. V. (1992). A recombinant sporozoite surface antigen of *Theileria parva* induces protection in cattle. *Proceeding National Academy Science*, 89: 514-551.

Mzabi, A.; Escotte-Binet, S.; Le Naour, R.; Ortis, N.; Audonnet, S.; Dardé, M.L.; Aubert, D. & Villena, I. (2015). Optimization of the cryopreservation of biological resources, *Toxoplasma gondii* tachyzoites, using flow cytometry. *Cryobiology*, 71(3): 459-463.

Narduche, L.; Hamond, C.; Martins, G. M. S.; Medeiros, M. A. & Lilembaum, W. (2016). Recovery of *Leptospire*s in short- and medium-term cryopreservation using different glycerol and dimethyl sulfoxide concentrations. *Biopreservation and Biobanking*, 14: 1-3.

Nash, T. E. (2002). Surface antigenic variation in *Giardia lamblia*. *Molecular Microbiology*, 45: 585-590.

Nash, T.E. & Aggarwal, A. (1986) Cytotoxicity of monoclonal antibodies to a subset of *Giardia* isolates. *Journal of Immunology*, 136: 2628-2632.

Nation, J. L. (1983). A new method using hexamethyldisilazane for preparation of soft insect tissues for scanning electron microscopy. *Florida Agricultural Experimental Station Journal*, 58 (6): 347-351.

Nerad, T. A. & Daggett, P. M. (1992). "Cultivation of selected colorless cryptomonads" (pp. 40-43) en *Protocols of protozoology* (ed. Lee, J. J. & Soldo, A.T.), Society of Protozoologists, Lawrence, Kansas, EEUU.

Nezafat, N., Karimi. Z.; Eslami, M.; Mohkam, M.; Zandian, S. & Ghasemi, Y. (2016). Designing an efficient multi-epitope peptide vaccine against *Vibrio cholerae* via combined immunoinformatics and protein interaction based approaches. *Computational Biology and Chemistry*, 62: 82-95.

Nielsen, H. (2017). "Predicting Secretory Proteins with SignalP" (pp. 59-73) en *Protein Function Prediction (Methods in Molecular Biology vol. 1611)* (ed. Kihara, D.) Springer. Berlín. Alemania.

Ning, D.; Junjian, X.; Xunzhang, W.; Wenyin, C.; Qing, Z; Kuanyuan, S.; Guirong, R.; Xiangrong, R.; Qingxin, L. & Zhouyao, Y. (2003).

Expression, purification, and characterization of humanized anti-HBs Fab fragment. *Journal of Biochemistry*, 134, 813-817.

Ninomiya, K. & Yamamoto, M. (2001). Efficacy of oil-adyuvanted vaccines for bacterial hemorrhagic ascites in ayu *Plecoglossus altivelis*. *Fish Pathology*, 36: 183-185.

Nishikimi, M.; Rao, N. A. & Yagi, K. (1972). The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 46: 849-853.

Noia, M.; Dominguez, B.; Leiro, J.; Blanco-Mendez, J.; Luzardo-Alvarez, A. & Lamas, J. (2014). Inflammatory responses and side effects generated by several adjuvant-containing vaccines in turbot. *Fish and Shellfish Immunol.*, 38: 244–254.

Noya, O., Patarroyo, M. E., Guzman, F. & Alarcon, de Noya (2003). Immunodiagnosis of parasitic diseases with synthetic peptides. *Current Protein and Peptide Science*, 4: 299-308.

Nsabimana, E.; Kisidayová, S.; Macheboeuf, D.; Newbold, C. J. & Jouany, J. P. (2003). Two-step freezing procedure for cryopreservation of rumen ciliates, and effective tool for creation of a frozen rumen Protozoa Bank. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 3826-3832.

Nurieva, R. I. & Chung, Y. (2010). Understanding the development and function of T follicular helper cells. *Cellular and Molecular Immunology*, 7(3): 190-197.

O'Farrell, P. H. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins, *Journal of biological chemistry*, 250(10): 4007-4021.

Ohnuma, M.; Kuroiwa, T. & Tanaka, K. (2011). Optimization of cryopreservation conditions for the unicellular red alga

Cyanidioschyzon merolae. The Journal of General and Applied Microbiology, 57(3): 137-143.

Olavarriá, V.; Gallardo, L.; Figueroa, J. & Mulero, V. (2010). Lipopolysaccharide primes the respiratory burst of Atlantic salmon SHK-1 cells through protein kinase C-mediated phosphorylation of p47phox. Developmental and Comparative Immunology, 34 (12): 1242-1253.

Orbegozo-Medina, R. A.; Martínez-Sernández, V.; Folgueira, I; Mezo, M.; González-Warleta, M.; Perteguer, M. J.; Romarís, F.; Leiro, J. M. & Ubeira, F. M. (2019). Antibody responses to chimeric peptides derived from parasite antigens in mice and other animal specie. Molecular immunology, 106: 1-11.

Ordás, M.; Costa, M.; Roca, F.; López-Castejón, G.; Mulero, V.; Meseguer, J.; Figueras, A. & Novoa, B. (2007). Turbot TNF-alpha gene: molecular characterization and biological activity of the recombinant protein. Molecular Immunology, 44(4): 389-400.

Papadioti, A.; Markoutsas, S.; Vranakis, I.; Tselentis, Y.; Karas, M.; Psaroulaki, A. & Tsiotis, G. (2011). A proteomic approach to investigate the differential antigenic profile of two *Coxiella burnetii* strains. Journal of proteomics, 74: 1150-1159.

Paramá, A.; Castro, R.; Arranz, J.; Sanmartín M.; Lamas, J. & Leiro, J. (2007a). Scuticociliate cysteine proteinases modulate turbot leucocyte functions. Fish and Shellfish Immunology, 23: 945-956.

Paramá, A.; Castro, R.; Lamas, J.; Sanmartín M.; Santamarina, M. & Leiro, J. (2007b). Scuticociliate proteinases may modulate turbot immune response by inducing apoptosis in pronephric leucocytes. International Journal for Parasitology, 37: 87-95.

Paramá, A.; Arranz, J. A.; Álvarez, M. F.; Sanmartín, M. L. & Leiro, J. (2006). Ultrastructure and phylogeny of *Philasterides dicentrarchi*

(Ciliophora, Scuticociliatia) from farmed turbot in NW Spain. *Parasitology*, 132(4): 555-564.

Paramá, A.; Luzardo, A.; Blanco-Méndez, J.; Sanmartín, M.L. & Leiro, J. (2005). *In vitro* efficacy of glutaraldehyde-crosslinked chitosan microspheres against the fish-pathogenic ciliate *Philasterides dicentrarchi*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 64(2): 151-158.

Paramá, A.; Iglesias, R.; Álvarez, M. F.; Leiro, J.; Aja, C. & Sanmartín, M. L. (2003). *Philasterides dicentrarchi* (Ciliophora, Scuticociliatida): experimental infection and possible routes of entry in farmed turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture* 217, 73–80.

Parker, A. R.; Lock, E.; Iftikhar, A.; Barber, R.; Stubbs, P. D.; Harding, S. % Wallis, G. L. F. (2016). Purification and characterisation of anti-pneumococcal capsular polysaccharide IgG immunoglobulins. *Clinical Biochemistry*; 30: 1-4.

Parret, A.; Besir, H. & Meijers, R. (2016). Critical reflections on synthetic gene design for recombinant protein expression. *Current Opinion in Structural Biology*, 38: 155-162.

Passerini, A.; Lippi, M. & Frasconi, P. (2011). MetalDetector v2.0: Predicting the Geometry of Metal Binding Sites from Protein Sequence. *Nucleic Acids Research*, 39: 288-292.

Patrapuvich, R.; Lerdpanyangam, K.; Jenwithisuk, R.; Rungin, S.; Boonhok, R.; Duangmanee, A.; Yimamnuyachok, N. & Sattabongkot, J. (2016). Viability and infectivity of cryopreserved *Plasmodium vivax* sporozoites. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 47(2): 171-181.

Pérez, T. Tesis Doctoral. Diseño y síntesis de péptidos para el diagnóstico de la infección por virus de la hepatitis G (GBV-C/HGV). Directores: Haro, I. y Ercilla, G. Universidad de Barcelona, Departamento de Físicoquímica, Facultad de Farmacia, Barcelona, España, 2007.

Piazzon, M. C., Leiro, J. & Lamas, J. (2014). Reprint of "Fish immunity to scuticociliate parasites". *Developmental and Comparative Immunology*, 43:280-289.

Piazzon, M.C.; Wiegertjes, G.F.; Leiro, J. & Lamas, J. (2011a). Turbot resistance to *Philasterides dicentrarchi* is more dependent on humoral than on celular immune responses. *Fish and Shellfish Immunology*, 30(6): 1339-13347.

Piazzon, C.; Lamas, J. & Leiro, M. J. (2011b). Role of scuticociliate proteinases in infection success in turbot, *Psetta maxima* (L.) *Parasite Immunology*, 33(10): 535-544.

Piazzon, C.; Lamas, J.; Castro, R.; Budiño, B.; Cabaleiro, S.; Sanmartín, M., & Leiro J. (2008). Antigenic and cross-protection studies on two turbot scuticociliate isolates. *Fish and Shellfish Immunology*, 25: 417-424.

Pimenta, P.F.; Da Silva, P.P. & Nash, T. (1991). Variant surface antigens of *Giardia lamblia* are associated with the presence of a thick cell coat: thin section and label fracture immunocytochemistry survey. *Infection and Immunity*, 59: 3989–3996.

Pinheiro, C.S.; Ribeiro, A.P.; Cardoso, F. C.; Martins, V. P.; Figueiredo, B. C.; Assis, N. R.; Morais, S. B.; Caliari, M. V.; Loukas, A. & Oliveira, S. C. (2014). A multivalent chimeric vaccine composed of *Schistosoma mansoni* SmTSP-2 and Sm29 was able to induce protection against infection in mice. *Parasite Immunology*, 36: 303-312.

Pischedda, A.; Ramasamy, K. P.; Mangiagalli, M.; Chiappori, F.; Milanese, L.; Miceli, C.; Pucciarelli, S. & Lotti, M. (2018) Antarctic marine ciliates under stress: superoxide dismutases from the psychrophilic *Euplotes Focardi* are cold-active yet heat tolerant enzymes. *Scientific Reports*, 8: 1-21.

Piscitelli, A.; Giardina, P.; Mazzoni, C. & Sannia, G. (2005). Recombinant expression of *Pleurotus ostreatus* laccases in *Kluyveromyces lactis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Genetics and Molecular Biotechnology*, 69: 428-439.)

Plewes, K. A.; Barr, S. D. & Gedamu, L. (2003). Iron superoxide dismutases targeted to the glycosomes of *Leishmania chagasi* are important for survival. *Infection and Immunity*, 71(10): 5910-5920.

Porro, D.; Sauer, M.; Branduardi, P. and Diethard, M. (2005). Recombinant protein production in yeasts. *Molecular Biotechnology*, 31: 245-259.

Priya, T. A. (2012). Codon changed immobilization antigen (iAg), a potent DNA vaccine in fish against *Cryptocaryon irritans* infection. *Vaccine*, 30: 893-903.

Prucca, C. G & Lujan, H. (2009). Antigenic variation in *Giardia lamblia*. *Cellular Microbiology*, 11(12): 1706-1715.

Puig, L.; Traveset, R.; Palenzuela, O. & Padrós, F. (2007). Histopathology of experimental scuticociliatosis in turbot *Scophthalmus maximus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 76: 131-140.

Purcell, A.W.; McCluskey, J. & Rassiohn, J. (2007). More than one reason to rethink the use of peptides in vaccine design. *Nature Reviews Drug Discovery*, 6: 404-414.

Qin, X.; Jin, P.; Jiang, T.; Li, M.; Tan, J.; Wu, H.; Zheng, L. & Zhao, J. (2018). A human chondrocyte-derived *in vitro* model of alcohol-induced and steroid-induced femoral head necrosis. *Medical Science Monitor*, 24: 539-547.

Quintela, J. M.; Peinador, C.; González, L.; Iglesias, R.; Paramá, A.; Álvarez, F.; Sanmartín, M. & Riguera, R. (2003). Piperazine Nsubstituted naphthyridines, pyridothienopyrimidines and

pyridothienotriazines: New antiprotozoals active against *Philasterides dicentrarchi*. European Journal of Medicinal Chemistry, 38(3): 265-275.

Quintero, J.; Figueroa, D. C.; Barcelo, R.; Brezi, D. (2013). Identification of an immunogenic protein of *Giardia lamblia* using monoclonal antibodies generated from infected mice. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz; 108(5): 616-622.

Rabillouda, T. & Lelongc, C. (2011). Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: A tutorial. Journal of proteomics, 74: 1829-1841.

Rahaman, A.; Miao, W. & Turkewitz, A. (2009). Independent transport and sorting of functionally distinct protein families in *Tetrahymena thermophila* dense core secretory granules. Eukaryotic cell, 8(10): 1575-1583.

Ramos, M. F.; Costa, A. R.; Barandela, T.; Saraiva, A. & Rodrigues, P. N. (2007). Scuticociliate infection and pathology in cultured turbot *Scophthalmus maximus* from the north of Portugal. Diseases of Aquatic Organisms, 74: 249-253.

Rauta, P. R.; Nayak, B. & Das, S. (2012). Immune system and immune responses in fish and their role in comparative immunity study: A model for higher organisms. Immunology Letters, 148: 23–33.

Ravelo, C.; Magarinos, B.; Herrero, M.; Costa, L.; Toranzo, A. & Romalde, J. (2006). Use of adjuvanted vaccines to lengthen the protection against lactococcosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture, 251: 153-1588.

Rawlinson, N. G. & Gates, M. A. (1989). A structural study of induced capsule formation in the ciliate *Colpidium colpoda*. Transactions of the American Microscopical Society, 108: 354-368.

Razin, S.; Yogev, D. & Naot, Y. (1998). Molecular biology and pathogenicity of *Mycoplasmas*. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 62: 1094-1156.

Rebl A.; Goldammer, T. & Seyfert H. (2010). Toll-like receptor signaling in bony fish. Veterinary Immunology and Immunopathology, 134(3-4): 139-150.

Reza, M.; Kontturi, E.; Jääskeläinen, A.; Vuorinen, T. & Ruokolainen, J. (2015). Transmission electron microscopy for wood and fiber analysis- A review. Bioresources, 10(3): 6230-6261.

Ricci, N.; Morelli, A. & Verni, F. (1996). The predation of *Litonotus* on *Euplotes*: a two-step cell-cell recognition process. Acta Protozoologica, 35:201-208.

Rijstenbil, J. W. & Buma, A. G. J. (2008). Oxidative stress responses in the marine Antarctic diatom *Chaetoceros brevis* (Bacillariophyceae) during photoacclimation. Journal of Phycology, 44: 957-966.

Riteau, N. & Sher, A. (2016). Chitosan: An Adjuvant with an Unanticipated STING. Immunity, 44: 522-524.

Rivero, F. D; Saura, A.; Prucca, C. G.; Carranza, P. G.; Torri, A. & Lujan, H. D. (2010). Disruption of antigenic variation is crucial for effective parasite vaccine. Nature Medicine, 16(5): 551-557.

Robinett, N. G.; Peterson, R. L. & Culotta, V. C. (2017). Eukaryotic copper-only superoxide dismutases (SODs): A new class of SOD enzymes and SOD-like protein domains. Journal of Biological Chemistry, 293(13): 4636-4643.

Roca F.; Mulero, I.; López-Muñoz, A.; Sepulcre, M.; Renshaw, S.; Meseguer, J. & Mulero, V. (2008). Evolution of the inflammatory response in vertebrates: fish TNF- α is a powerful activator of endothelial cells but hardly activates phagocytes. Journal of Immunology, 181(7): 5071-5081.

Rocha, T. L.; Patherson, G.; Crimmins, K.; Boyd, A.; Sawyer, L. & Fothergill-Gilmore, L. A. (1996). Expression and secretion of recombinant ovine β -lactoglobulin in *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces lactis*. *Biochemistry Journal*, 313: 927-932.

Rodgers, C. J. & Furones, M. D. (2011). Guía para la gestión sanitaria en acuicultura. Plan Nacional de Gestión Sanitaria de la Acuicultura (GESAC): Adaptación a la nueva normativa. Junta Nacional Asesora de Cultivos Marinos (JACUMAR). Secretaría General del Mar. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino.

Rodríguez, J. L. (2011). Cultivo del rodaballo (*Scophthalmus maximus*). Fundación Observatorio Español de Acuicultura, 4: 4-6.

Rodríguez, J. L. & Fernández, B. (2005). Programa de información de especies acuáticas. *Psetta máxima*. Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO.

Rodríguez-Ramilo, S. T.; Fernández, J.; Toro, M. A.; Bouza, C.; Hermida, M.; Fernández, C.; Pardo, B. G.; Cabaleiro, S. & Martínez, P. (2013). Uncovering QTL for resistance and survival time to *Philasterides dicentrarchi* in turbot (*Scophthalmus maximus*). *Animal Genetics*, 44(2): 149-57.

Ron, A.; Williams, N. E. & Doerder, F. P. (1992). The immobilization antigens of *Tetrahymena thermophila* are glycoproteins. *Journal of Protozoology*, 39: 508-510.

Rosati, G. & Modeo, L. (2003). Extrusomes in ciliates: diversification, distribution, and phylogenetic implications. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 50:383-402.

Rosenberg, H. F. (1998). Isolation of recombinant secretory proteins by limited induction and quantitative harvest. *BioTechniques*, 24: 188-191.

Rosengarten, R.; Levisohn, S. & Yogev, D. (1995). A 41-kDa variable surface protein of *Mycophma galhepticum* has a counterpart in *Mycoplasma imitans* and *Mycoplasma iowae*. FZMS Microbiology letters, 132: 115-123.

Rosso, L. C. (2009). Cloning.; Sequence.; and Expression Analysis of a New MnSOD-Encoding Gene from the Root-Knot Nematode *Meloidogyne incognita*. Journal of Nematology, 41(1): 52-59.

Rossteuscher, S.; Wenker, C.; Jermann, T.; Wahli, T.; Oldenberg, E & Schmidt-Posthaus, H. (2008). Severe scuticociliate (*Philasterides dicentrarchi*) infection in a population of sea dragons (*Phycodurus eques* and *Phyllopteryx taeniolatus*). Veterinary Parasitology, 45(4): 546-550.

Sanmartín, M.L.; Paramá, A.; Castro, R.; Cabaleiro, S.; Leiro, J.; Lamas, J. & Barja J. (2008). Vaccination of turbot, *Psetta maxima* (L.), against the protozoan parasite *Philasterides dicentrarchi*: effects on antibody production and protection. Journal of Fish Diseases, 31(2): 135-140.

Santoferrara, L. F.; Guida, S.; Zhang, H. & McManus, G. B. (2014). De Novo Transcriptomes of a Mixotrophic and a Heterotrophic Ciliate from Marine Plankton. PLoS ONE, 9(7): 1014-1018.

Santos, F. L. N.; Celedon, P. A. F.; Zanchin, N. I. T.; Leitolis, A.; Crestani, S.; Foti, L.; de Souza, W. V.; Gomes, Y. M. & Krieger, M. A. (2017). Performance assessment of a *Trypanosoma cruzi* chimeric antigen in multiplex liquid microarray assays. Journal of Clinical Microbiology, 55: 2934-2945.

Sarobe, P.; Lasarte, J. J.; Larrea, E.; Golvano, J. J.; Prieto, I.; Gullón, A.; Prieto, J. & Borrás-Cuesta, F. (1993). Enhancement of peptide immunogenicity by insertion of a cathepsin B cleavage site between determinants recognized by B and T cells. Research in Immunology, 144: 257-262.

- Sattin, G. Bakiu, R.; Tolomeo, A. M.; Carraro, A.; Coppola, D.; Ferro, D.; Patarnello, T. & Santovito, G. (2015). Characterization and expression of a new cytoplasmic glutathione peroxidase 1 gene in the Antarctic fish *Trematomus bernacchii*. *Hydrobiologia*, 761: 363-372.
- Satir, B. H. (1989). Signal transduction events associated with exocytosis in ciliates. *Journal of Protozoology*, 36, 382-389.
- Sauer, M. K. & Kelly, R. B. (1995). Conjugation rescue of exocytosis mutants in *Tetrahymena thermophila* indicates the presence of functional intermediates in the regulated secretory pathway. *Journal of Eukariotic Microbiology*, 42: 173-183.
- Schinkel, H.; Streller, S. & Wingsle, G. (1998). Multiple forms of extracellular superoxide dismutase in needles; stem tissues and seedlings of Scots pine. *Journal of Experimental Botany*, 49(323): 931-936.
- Schott, E. J. & Vasta, G. R. (2003). The PmSOD1 gene of the protistan parasite *Perkinsus marinus* complements the *sod2* Delta mutant of *Saccharomyces cerevisiae* and directs an iron superoxide dismutase to mitochondria. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 126(1): 81-92.
- Schubert, B. & Kohlbacher, O. (2016). Designing string-of-beads vaccines with optimal spacers. *Genome Medicine*, 8: 1-10.
- Seferian, P. G & Martínez, M. L. (2001). Immune stimulating activity of two new chitosan containing adjuvant formulations. *Vaccine*, 19: 661-668.
- Senel, S. & McClure, S.J. (2004). Potential applications of chitosan in veterinary medicine. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56: 1467-1480.
- Serradell, M. C.; Saura, A.; Rupil, L. L.; Gargantini, P. R.; Faya, M. I.; Furlan, P. J. & Lujan, H. (2016). Vaccination of domestic animals with

a novel oral vaccine prevents *Giardia* infections, alleviates signs of giardiasis and reduces transmission to humans. NPJ Vaccines, 1: 16-18.

Sette, A. & Fikes, J. (2003). Epitope-based vaccines: an update on epitope identification, vaccine design and delivery. Current Opinion Immunology, 15: 461-470.

Shao, W.; Pedrioli, P. G. A.; Wolski, W.; Scurtescu, C.; Schmid, E.; Vizcaíno, J. A.; Courcelles, M.; Schuster, H.; Kowalewski, D. & Marino, F. (2017). The SystemMHC Atlas project. Nucleic Acids Research, 4(46): 1237-1247.

Shaw-Saliba, K.; Clarke, D.; Santos, J. M.; Menezes, M. J.; Lim, C.; Mascarenhas, A.; Chery, L.; Gomes, E.; March, S.; Bhatia, S. N.; Rathod, P. K.; Ferreira, M. U.; Catteruccia, F. & Duraisingh, M. T. (2016). Infection of laboratory colonies of *Anopheles mosquitoes* with *Plasmodium vivax* from cryopreserved clinical isolates. International Journal Parasitology, 46(11): 679-683.

Sheng, S. & Kong, F. (2012). Separation of antigens and antibodies by immunoaffinity chromatography. Pharmaceutical Biology, 50(8): 1038-1044.

Sheng, Y.; Abreu, I. A.; Cabelli, D. E.; Maroney, M. J.; Miller, A. F.; Teixeira, M. & Valentine, J. S. (2014). Superoxide dismutases and superoxide reductases. Chemical Review, 114(7): 3854-3918.

Shih SJ, Nelson DL (1991). Multiple families of proteins in the secretory granules of *Paramecium tetraurelia*: immunological characterization and immunocytochemical localization of trichocyst proteins. Journal of Cell Science, 100: 85-97.

Sievers, F.; Wilm, A.; Dineen, D.; Gibson, T. J.; Karplus, K.; Li, W.; López, R.; McWilliam, H.; Remmert, M.; Söding, J.; Thompson, J. D. & Higgins, D. G. (2011). Fast scalable generation of high-quality

protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology*, 7: 539-345.

Silva-Flannery, L. M.; Cabrera-Mora, M.; Jiang, J. & Moreno, A. (2009). Recombinant peptide replicates immunogenicity of synthetic linear peptide chimera for use as pre-erythrocytic stage malaria vaccine. *Microbes and Infection*, 11: 83-91.

Simione, E.E & Brown, E. M. (1991). ATCC preservation methods: freezing and freeze-drying. American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, EEUU.

Simon, M. C. & Schmidt, H. J. (2007). Antigenic variation in Ciliates: antigen structure, function, expression. *Journal of Eukaryotic and Microbiology*, 54(1): 1-7.

Singer, S. M.; Elmendorf, H. G.; Conrad, J. T. & Nash, T. E. (2001). Biological selection of variant-specific surface proteins in *Giardia lamblia*. *Journal of Infectious Diseases*, 183(1): 119-124.

Smith, D. L. (1992). Characterization of the T, L, I, S, M and P cell surface (immobilization) antigens of *Tetrahymena thermophila*: molecular weights, isoforms, and cross-reactivity of antisera. *Journal of Protozoology*, 39: 420-428.

Smith, M. C.; Furman, T. C.; Ingoliaq, T. D. & Pidgeony, C. (1988). Chelating peptide-immobilized metal ion affinity chromatography a new concept in affinity chromatography for recombinant proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 263 (15): 7211-7215.

Smith, P. J.; McVeagh, S. M.; Hulston, D.; Anderson, S. A. & Gublin, Y. (2009). DNA identification of ciliates associated with disease outbreaks in a New Zealand marine fish hatchery. *Diseases of Aquatic Organisms*, 86(2): 163-167.

Solares, A. M.; Baladron, I.; Ramos, T.; Valenzuela, C.; Borbon, Z.; Fanjull, S.; Gonzalez, L.; Castillo, D.; Esmir, J. & Granadillo, M.

(2011). Safety and immunogenicity of a human papillomavirus peptide vaccine (CIGB-228) in women with high-grade cervical intraepithelial neoplasia: first-in-human, proof-of-concept trial. *ISRN Obstetrics and Gynecology*, 2011: 1-9.

Soldo A.T. & Merlin, E.J. (1972). The cultivation of symbiote-free ciliates in axenic medium. *Journal Protozoology*, 19: 519-524.

Somasundaram, S.; Abraham, J. S.; Maurya, S.; Makhija, S.; Gupta, R. & Toteja, R. (2018). Cellular and molecular basis of heavy metal-induced stress in ciliates. *Current Science*, 114(9): 1858-1865.

Sommerset, I.; Krossøy, B.; Biering, E. & Frost, P. (2005). Vaccines for fish in aquaculture. *Expert Review of Vaccines*, 4: 89-101.

Sommerville, L. (1970). Serotype expression in *Paramecium*. *Advances in Microbiology and Physiology*, 4: 131-178.

Song, J. Y.; Kitamura, S.; Oh, M. J.; Kang, H. S.; Lee, J. H.; Tanaka, S. J. & Jung, S. J. (2009). Pathogenicity of *Miamiensis avidus* (syn. *Philasterides dicentrarchi*), *Pseudocohnilembus persalinus*, *Pseudocohnilembus hargisi* and *Uronema marinum* (Ciliophora, Scuticociliatida). *Diseases of Aquatic Organisms Journal*, 83(2): 133-143.

Sørensen, A.; Nagai, S.; Houen, G.; Andersen, P. & Andersen, A. B. (1995). Purification and characterization of a low-molecular-mass t-cell antigen secreted by mycobacterium tuberculosis. *Infection and Immunity*, 63: 1710-1717.

Sørensen, H. P. & Mortensen. K. K. (2005). Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, 115: 113-128.

Steentoft C, Vakhrushev SY, Joshi HJ, Kong Y, Vester-Christensen MB, Schjoldager KT, Lavrsen K, Dabelsteen S, Pedersen NB, Marcos-Silva L, Gupta R, Bennett EP, Mandel U, Brunak S, Wandall HH,

Leverly SB, Clausen H. (2013). Precision mapping of the human O-GalNAc glycoproteome through SimpleCell technology. *EMBO Journal*, 32:1478-1488.

Stephen, D. J. & Allan, V. J. (2003). Light Microscopy Techniques for Live Cell Imaging. *Science*, 300 (82): 82-86.

Strålin, P. & Marklund, S. L. (1994). Effects of oxidative stress on expression of extracellular superoxide dismutase.; CuZn-superoxide dismutase and Mn-superoxide dismutase in human dermal fibroblasts. *Biochem Journal*, 29 (2): 347-352.

Streller, S. & Wingsle, G. (1994). *Pinus sylvestris* L. needles contain extracellular CuZn superoxide dismutase. *Planta*, 192(2): 195-201.

Subramanian, A. (2002). Immunoaffinity chromatography. *Molecular Biotechnology*, 20: 41-47.

Sugiura, M. & Harumoto, T. (2001). Identification, characterization, and complete amino acid sequence of the conjugation-inducing glycoprotein (blepharmon) in the ciliate *Blepharisma japonicum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 4(25): 14446-14451.

Suguwara, Y. & Sakai, A. (1974). Survival of suspension-cultured sycamore cells cooled to temperature of liquid nitrogen. *Plant Physiology* 54: 722-724.

Sultana, T.; Haque, M. M.; Salam, M. A. & Alam, M. M. (2017). Effect of aeration on growth and production of fish in intensive aquaculture system in earthen ponds. *Journal of Bangladesh University*, 15:113-122.

Summerfelt, S. T. (2003) Ozonation and UV irradiation -an introduction and examples of current applications. *Aquacultural Engineering*, 28: 21-36.

Tafalla, C.; Bøggwald, J. & Dalmo, R.A. (2013). Adjuvants and immunostimulants in fish vaccines: Current knowledge and future perspectives. *Fish & Shellfish Immunology*, 30: 1-11.

Takahashi, H.; Cease, K. B. & Berzofsky, J. A. (1989). Identification of proteases that process distinct epitopes on the same protein. *Journal of Immunology*, 142: 2221-2229.

Talmadge, K. & Gilbert, W. (1982). Cellular location affects protein stability in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 79: 1830-1833.

Tang, L.; Ou, X.; Henkle-Dührsen, K. & Selkirk, M. E. Extracellular and cytoplasmic CuZn superoxide dismutases from *Brugia lymphatic* filarialnematode parasites. *Infection and Immunity*, 62(3): 961-967.

Tas J. (1977). The Alcian Blue and combined Alcian Blue-Safranin O staining of glycosaminoglycans studied in a model system and in mast cell. *Histochemistry Journal*, 9: 205-230.

Tavassoli, M.; Javadi, S.; Naem, S. & Vahed, G. (2009). Effects of different concentrations of DMSO and glycerol on cryopreservation of *Trichomonas gallinae*. *International Journal of Veterinary Sciences and Medicine*, 3(2): 83-86.

Taylor, W. D. & Sanders, R. W. (2010). "Protozoa" (pp. 49-90) en *Ecology and Classification of North American Freshwater Invertebrates*. Third Edition (ed. Thorp, J. H. & Covich, A. P.). Academic Press. Massachusetts, Estados Unidos.

Terpe K. (2006). Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72(2): 211-222.

Thompson, J. C. & Moewus, L. (1964). *Miamiensis avidus* n. g., n. sp., a Marine Facultative Parasite in the Ciliate Order Hymenostomatida. The Journal of Protozoology, 11(3): 378–381.

Thorn, K. (2016). A quick guide to light microscopy in cell biology. Molecular biology of the cell, 27: 219-222.

Tiedtke, A. & Hünseler, P. (1990). Exocytosis, endocytosis and membrane recycling in *Tetrahymena thermophila*. Journal of cell science, 89: 515-520.

Tiedtke, A.; Hünseler, P. & Rasmussen, L. (1988). Growth requirements of a new food-vacuole-less mutant of *Tetrahymena*. European Journal of Protistology, 23:350-353.

Tiedtke A. (1976). Capsule shedding in *Tetrahymena*. Naturwissenschaften, 63: 93.

Tindall, S. H.; De Vito, L.D. & Nelson, D. L. (1989). Biochemical characterization of the secretory granules. Journal of Cellular Science, 92: 441-447.

Tokuyasu, K. & Scherbaum, O. H. (1965). Ultrastructure of mucocysts and pellicle of *Tetrahymena pyriformis*. Journal of Cell Biology, 27: 87-81.

Turkewitz, A. P.; Madeddu, L. & Kelly, R. B. (1991): Maturation of dense core granules in wild type and mutant *Tetrahymena thermophila*. EMBO Journal, 10: 1979-1987.

Urrutxurtu, I.; Orive, E. & de la Sota, A. (2003) Seasonal dynamics of ciliated protozoa and their potential food in an eutrophic estuary (Bay of Biscay). Estuarine, Coastal and Shelf Science, 57: 1169-1182.

Van Buskirk, R. G.; Snyder, K. K.; Baust, J. M.; Mathew, A. J. & Baust, J. G. (2004). Hypothermic storage and cryopreservation. The issues of successful short-term and long term preservation of cells and tissues. Bioprocess International, 2: 42-49.

Verbsky, J.W. & Turkewitz, A. P. (1998). Proteolytic processing and Ca^{2+} binding activity of dense-core vesicle polypeptides in *Tetrahymena*. *Molecular Biology of the Cell*, 9: 497-511.

Verma, A.; Chandele, A.; Nayak, K.; Kajac, M. K.; Arulandud, A.; Lodha, R. & Ray, P. (2016). High yield expression and purification of Chikungunya virus E2 recombinant protein and its evaluation for serodiagnosis. *Journal of Virological Methods*, 235:73-79.

Viscogliosi, E.; Delgado-Viscogliosi, P.; Gerbod, D.; Dauchez, M.; Gratepanche, S.; Alix, A. J. & Dive, D. (1998). Cloning and expression of an iron-containing superoxide dismutase in the parasitic protist; *Trichomonas vaginalis*. *FEMS Microbiol Letters*, 161(1): 115-123.

Von Stein, O. D.; Thies, W. G. & Hofmann, M. (1997). A high throughput screening for rarely transcribed differentially expressed genes. *Nucleic Acids Research*, 25: 2598-2602.

Walker, P. J. & Ashwood-Smith, M. J. (1961). Dimethyl sulphoxide, an alternative to glycerol, for the low-temperature preservation of trypanosomes. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 55: 93-96.

Wang, Q.; Yu, Y.; Zhang, X. & Xu, Z. (2019). Immune responses of fish to *Ichthyophthirius multifiliis* (Ich): A model for understanding immunity against protozoan parasites. *Developmental and Comparative Immunology*, 93: 93–102.

Wang, X. & Dickerson, H. W. (2002). Surface Immobilization Antigen of the Parasitic Ciliate *Ichthyophthirius multifiliis* Elicits Protective Immunity in Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*). *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 9(1): 176-181.

Wang, X.; Clark, T.G.; Noe, J. & Dickerson, H. W. (2002). Immunisation of channel catfish, *Ictalurus punctatus*, with

Ichthyophthirius multifiliis immobilisation antigens elicits serotype-specific protection. *Fish and Shellfish Immunology*, 13: 337-350.

Waterhouse, A.; Bertoni, M.; Bienert, S.; Studer, G.; Tauriello, G.; Gumienny, R.; Heer, F. T.; de Beer, T. A. P, Rempfer, C.; Bordoli, L.; Lepore, R. & Schwede, T. (2018). SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Research*, 46: 296-303.

Watson, P. F. (1995). Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction, Fertility and Development*, 7: 871–891.

Wen, X.; Cao, D.; Jones, R. W.; Hoshino, Y. & Yuan, L. (2015). Tandem truncated rotavirus VP8 subunit protein with T cell epitope as non-replicating parenteral vaccine is highly immunogenic. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*, 11: 2483-2489.

Wen, Z. S.; Xu, Y. L.; Zou, X. T. & Xu, Z. R. (2011). Chitosan nanoparticles act as an adjuvant to promote both Th1 and Th2 immune responses induced by ovalbumin in mice. *Marine Drugs*, 9 (6): 1038–1055.

Westermann, A. J.; Gorski, S. A. & Vogel, J. (2012). Dual RNA-seq of pathogen and host. *National Review Microbiology*, 10(9):618-630.

Weydert, C. J. & Cullen, J. J. (2010). Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. *Nature Protocols*, 5: 51-66.

Wicklow, B. J. (1997). Signal-induced Defensive Phenotypic Changes in Ciliated PProtists: Morphological and Ecological Implications for Predator and Prey. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 44(3): 176-188.

Wilkinson, S. R.; Prathalingam, S. R.; Taylor, M. C.; Ahmed, A.; Horn, D. & Kelly, J. M. (2006). Functional characterization of the iron superoxide dismutase gene repertoire in *Trypanosoma brucei*. *Free Radical Biology and Medicine*, 40: 193-195.

Williams, N. E. & Luft, J.H. (1968). Use of a nitrogen mustard derivative in fixation for electron microscopy and observations of the ultrastructure of *Tetrahymena*. *Journal of Ultrastructure Research*; 25: 271-292.

Withers, L. A. & Street, H. E. (1977). Freeze-preservation of cultured plant. III. The pregrowth phase. *Physiologia Plantarum*, 39: 171-178.

Wolf, J. B. W.; Bayer, T. & Haubold, B. (2010). Nucleotide divergence versus gene expression differentiation: comparative transcriptome sequencing in natural isolates from the carrion crow and its hybrid zone with the hooded crow. *Molecular Ecology*, 19: 162-175.

Wolfe, J. (1988). Analysis of *Tetrahymena* mucocyst material with lectins and alcian blue. *Journal of Protozoology*, 35: 46-51.

Woods, A. E. & Stirling, J. W. (2013). Cap. 21 "Transmission electron microscopy" (pp. 434-476) en *Bancroft's theory and practice of histological techniques* (ed. Survana, S. K.; Layton, C. & Bancroft, J. D.). Elsevier. Amsterdam, Países Bajos

Xiong, J.; Wang, G.; Cheng, J.; Tian, M.; Pan, X.; Warren, A.; Jiang, C.; Yuan, D. & Miao, W. (2015). Genome of the facultative scuticociliatosis pathogen *Pseudocohnilembus persalinus* provides insight into its virulence through horizontal gene transfer. *Scientific Reports*, 5(15470): 1-12.

Xiong, J.; Lu, Y.; Feng, J.; Yuan, D.; Tian, M.; Chang, Y.; Fu, C.; Wang, G.; Zeng, H. & Miao, W. (2013). *Tetrahymena* genomics database (TetraFGD): an integrated resource for *Tetrahymena* functional genomics. *Database, the Journal of Biological Databases and Curation*, 2013: 1-6.

Xu, D. H.; Panangala, V. S.; van Santen, V. L.; Dybvig, K.; Abernathy, J. W.; Klesius, P. H.; Liu, Z. J. & Russo, R. (2009). Molecular characteristics of an immobilization antigen gene of the fish-parasitic protozoan *Ichthyophthirius multifiliis* strain ARS-6. *Aquaculture Research*, 40: 1884-1892.

Yachdav, G.; Kloppmann, E.; Kajan, L.; Hecht, M.; Goldberg, T.; Hamp, T.; Hönigsmid, P.; Schafferhans, A.; Roos, M.; Bernhofer, M.; Richter, L.; Ashkenazy, H.; Punta, M.; Schlessinger, A.; Bromberg, Y.; Schneider, R.; Vriend, G.; Sander, C.; Ben-Tal, N. & Rost, B. (2014). PredictProtein--an open resource for online prediction of protein structural and functional features. *Nucleic Acids Research*, 42: 337-343.

Yano, A.; Onozuka, A.; Asahi-Ozaki, Y.; Imai, S.; Hanada, N.; Miwa, Y. & Nisizawa, T. (2005). An ingenious design for peptide vaccines. *Vaccine*, 23(17-18): 2322-2326.

Yogev, D.; Menaker, D.; Strutzberg, K.; Levisohn, S.; Kirchhoff, H.; Hinz, K-H. & Rosengarten, R. (1994). A surface epitope undergoing high-frequency phase variation is shared by *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma bovis*. *Infection and immunity*, 62(11): 4962-4968.

Zhang, Y. Z. & Shen, H. B. (2017). Signal-3L 2.0: A hierarchical mixture model for enhancing protein signal peptide prediction by incorporating residue-domain cross level features. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 57: 988-999.

Zhang, G. L.; Srinivasan, K. N.; Veeramani, A.; August, J. T. & Brusic, V. (2005). PREDBALB/c: a system for the prediction of peptide binding to H2d molecules, a haplotype of the BALB/c mouse. *Nucleic Acids Research*, 33: 180-183.

Zhang, J.; Fu, X.; Zhang, Y.; Zhu, W.; Zhou, Y.; Yuan, G.; Liu, X.; Ai, T.; Zeng, L. & Su, J. (2019). Chitosan and anisodamine improve the immune efficacy of inactivated infectious spleen and kidney necrosis

virus vaccine in *Siniperca chuatsi*. Fish and Shellfish Immunology, 89: 52-60.

Zhang, J.; Hu, Y. H.; Xiao, Z. Z. & Sun, L. (2013). Megalocytivirus-induced proteins of turbot (*Scophthalmus maximus*): identification and antiviral potential. Journal of Proteomics, 8(91): 430-443.

Zhu, W.; Zhang, Y.; Zhang, J.; Yuan, G.; Liu, X.; Ai, T. & Su, J. (2019). Astragalus polysaccharides, chitosan and poly (I:C) obviously enhance inactivated *Edwardsiella ictaluri* vaccine potency in yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*. Fish and Shellfish Immunology, 87: 379-385.

Zuckerkandl, E. & Pauling, L. (1965). “Evolucionaary divergence and convergence in protein” (pp. 97-166) en Evolving genes and proteins (ed. Bryson, V. & Vogel, H. J.). Academic Press. Nueva York. EEUU.

<http://ailab.ist.psu.edu/bcpreds/predict.html>

<http://www.ddg-pharmfac.net/vaxijen/VaxiJen/VaxiJen.html>

<https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/1602015-Protein-Purification-Handbook.pdf>

[Sin autores] A.P.R.O.M.A.R (2016). La acuicultura en España.

[Sin autores] A.P.R.O.M.A.R (2018). La acuicultura en España.

[Sin autores] A.P.R.O.M.A.R., E.S.A.C.U.A. y O.P.P. (2014). La Acuicultura en España 2014. En: http://www.observatorio-acuicultura.es/sites/default/files/images/adjuntos/libros/acuicultura_en_esp2014.pdf

BIBLIOGRAFIA

[Sin autores] F.A.O. (2014). El estado mundial de la pesca y la acuicultura.

[Sin autores] F.A.O. (2018). El estado mundial de la pesca y la acuicultura.

[Sin autores] Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino y Junta Nacional Asesora de Cultivos Marinos (JACUMAR) (2006). Información sobre el rodaballo y su cultivo. En: <http://www.magrama.gob.es/app/jacumar/especies/Documentos/Rodaballo.pdf>

[Sin autores] Thermo Scientific Pierce Protein Purification Technical Handbook (2010).